

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KAMILLA LOUISE SCHNEIDER

**Otimização das condições ambientais para produção de etanol a partir do
melaço de soja.**

CURITIBA

2016

KAMILLA LOUISE SCHNEIDER

**Otimização das condições ambientais para produção de etanol a partir do
melaço de soja.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas no curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, Área de Concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos. Produção e Qualidade.

Orientadora: Profa. Dra. Tania Maria Bordin Bonfim

Coorientadora: Profa. Dra. Débora Brand

CURITIBA

2016

Schneider, Kamilla Louise
Otimização das condições ambientais para produção de etanol a partir do melaço de soja / Kamilla Louise
Schneider - Curitiba, 2016.
57 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Tania Maria Bordin Bonfim
Coorientadora: Professora Dra. Débora Brand
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da
Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Etanol. 2. Metodologia. 3. Fermentação. 4. *Saccharomyces cerevisiae*. I. Bonfim, Tania Maria Bordin.
II. Brand, Débora. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

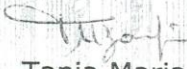
CDD 664.024

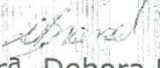
TERMO DE APROVAÇÃO

KAMILLA LOUISE SCHNEIDER


Título: "Otimização das condições ambientais para produção de etanol a partir do melaço de soja"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Profª. Drª. Tania Maria Bordin Bonfim
Orientadora


Profª. Drª. Debora Brand
Co-orientadora


Profª. Drª. Grace Maria Ferreira de Castro Wille
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Cleverton Antônio Ferreira Martins
Universidade Tuiuti do Paraná

Curitiba, 30 de agosto de 2016.

RESUMO

O melaço de soja é um resíduo agroindustrial produzido durante o beneficiamento da soja. Pesquisas têm sido realizadas para a valorização do resíduo agroindustrial e diminuição da poluição causada pela sua produção. A produção de álcool a partir do de melaço de soja é foco em diversos trabalhos científicos por apresentar em grande concentração carboidratos fermentescíveis. O presente trabalho visa a utilização do resíduo melaço de soja para produção de etanol por meio de processos fermentativos utilizando a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e otimização das variáveis: concentração inicial de açúcares e concentração inicial de inóculo empregando metodologia de superfície de resposta. Para otimização do processo fermentativo foram testadas concentrações iniciais de açúcares totais variando de 100 g.L⁻¹ até 200 g.L⁻¹ e concentrações iniciais de inóculo variando de 4,5 g.L⁻¹ até 17 g.L⁻¹. Todos os processos fermentativos foram conduzidos em temperatura de 28 °C e pH inicial 5,5 ± 0,2. A condição otimizada do processo obtida foi de 146,429 g.L⁻¹ de concentração inicial de açúcares totais e 14,77 g.L⁻¹ de concentração inicial de inóculo resultado em teor alcoólico teórico máximo de 5,12 °GL a 20 °C. A validação do modelo resultou em teor alcoólico de 4,51 ± 0,23 °GL em 36 horas. O processo fermentativo conduzido nas condições otimizadas representa um potencial de uso sustentável do resíduo agroindustrial melaço de soja.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. Melaço de soja. Metodologia de superfície de resposta.

ABSTRACT

The soy molasses is an agro-industrial waste produced during the processing of soybeans. Research are been made to ad-value to these agro-industrial waste and to reduce pollution caused by its production. Production of alcohol from soy molasses are object of several scientific paper as soy molasses present high concentration of fermentable carbohydrates. This work aims to use the residue soy molasses for ethanol production through fermentation processes using commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 and to optimize the variables: initial total carbohydrate concentration and initial inoculum concentration through response surface methodology. To optimize the fermentation process initial total sugars concentrations were tested ranging from 100 to 200 g.L⁻¹ and initial inoculum concentrations ranging from 4.5 to 17.0 g.L⁻¹. All fermentation processes were conducted at 28 °C and pH at 5.5 ± 0.2. The optimized process condition obtained was 146.429 g.L⁻¹ of initial total sugars concentration and 14.77 g.L⁻¹ of the initial inoculum concentration that resulted in a theoretical maximum alcohol content of 5.12 ° GL at 20 ° C. The model validation resulted in alcohol content of 4.51 ± 0.23 ° GL in 36 hours. The fermentation process conducted in optimal conditions is a potential for a sustainable use of agro-industrial soy molasses residue.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*. Soy molasses. Response surface methodology

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA REAÇÃO BIOQUÍMICA GLICÓLISE EM LEVEDURAS	21
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS REAÇÕES DE RESPIRAÇÃO CELULAR E FERMENTAÇÃO EM CÉLULAS DE LEVEDURAS.....	22

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR TOTAL (g.L ⁻¹), TEOR ALCOÓLICO (°GL) À 20 °C, pH E CONCENTRAÇÃO DE ACIDEZ VOLÁTIL (meq.L ⁻¹) EM FUNÇÃO DO TEMPO DO PROCESSO EMPREGANDO MOSTO DE MELAÇO DE SOJA E INOCULADO COM CONCENTRAÇÃO INICIAL DE 0,1 g.L ⁻¹ DE CÉLULAS DA LEVEDURA COMERCIAL <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CAT-1).....	37
GRÁFICO 2 - CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR TOTAL (g.L ⁻¹), TEOR ALCOÓLICO (°GL) À 20 °C (a), pH e CONCENTRAÇÃO DE ACIDEZ VOLÁTIL (meq.L ⁻¹) (b) NOS PROCESSOS INICIADOS COM 0,1 g.L ⁻¹ DE CÉLULAS ADAPTADAS EM MELAÇO DE SOJA DA LEVEDURA COMERCIAL <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CAT-1) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO (horas).	38
GRÁFICO 3 - CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR TOTAL (g.L ⁻¹), TEOR ALCOÓLICO (°GL) À 20 °C (a), pH E CONCENTRAÇÃO DE ACIDEZ VOLÁTIL (meq.L ⁻¹) (b) NO PROCESSO COM MOSTO MELAÇO DE SOJA E INICIADO COM 0,2 g.L ⁻¹ DE CÉLULAS DA LEVEDURA COMERCIAL <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CAT-1).	39
GRÁFICO 4 - CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR TOTAL (g.L ⁻¹), TEOR ALCOÓLICO (°GL) À 20 °C (a), pH E CONCENTRAÇÃO DE ACIDEZ VOLÁTIL (meq.L ⁻¹) (b) NO PROCESSO COM MOSTO MELAÇO DE SOJA E INICIADO COM 1,0 g.L ⁻¹ DE CÉLULAS DA LEVEDURA COMERCIAL <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CAT-1).	41
GRÁFICO 5 - CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR TOTAL (g.L ⁻¹), TEOR ALCOÓLICO (°GL) À 20 °C (a), pH E CONCENTRAÇÃO DE ACIDEZ VOLÁTIL (meq.L ⁻¹) (b) NO PROCESSO COM MOSTO MELAÇO DE SOJA ADICIONADO DE ÁCIDO SULFÚRICO E INICIADO COM 1,0 g.L ⁻¹ DE CÉLULAS DA LEVEDURA COMERCIAL <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CAT-1).....	43
GRÁFICO 6 - GRÁFICO DE CONTORNO PARA A RESPOSTA TEOR ALCOÓLICO	49
GRÁFICO 7 - GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O TEOR ALCOÓLICO.....	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DESIGNAÇÃO DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS, MASSA DE MELAÇO DE SOJA EMPREGADA NO MOSTO E PERCENTUAL DE MELAÇO DE SOJA NOS MOSTOS	29
TABELA 2 - VARIÁVEIS E SEUS NÍVEIS CODIFICADOS E REAIS NA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	32
TABELA 3 - CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR TOTAL INICIAL g.L ⁻¹ , PORCENTAGEM DE MELAÇO DE SOJA NO MOSTO %(p/v) E MASSA DE MELAÇO DE SOJA PESADO.....	33
TABELA 4 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS AÇÚCARES NO MELAÇO DE SOJA	35
TABELA 5 - CONDIÇÕES DELINEADAS PELA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	47
TABELA 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO MODELO DE REGRESSÃO PARA A RESPOSTA TEOR ALCOÓLICO	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 SOJA.....	14
3.2 MELAÇO DE SOJA	15
3.3 PRODUÇÃO DE ÁLCOOL A PARTIR DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL MELAÇO DE SOJA	17
3.4 BIOQUIMISMO DA FORMAÇÃO DE ETANOL.....	19
3.5 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 MICRO-ORGANISMO.....	26
4.2 MATÉRIA-PRIMA.....	26
4.3 PREPARO DO INÓCULO	26
4.3.1 Hidratação das células	26
4.3.2 Desenvolvimento do inóculo.....	27
4.4 PROCESSOS FERMENTATIVOS	28
4.5 ANÁLISES.....	30
4.5.1 Determinação da concentração celular	30
4.5.2 Determinação de açúcar total.....	30
4.5.3 Medição de valor de pH.....	30
4.5.4 Medição de teor alcoólico.....	31
4.5.5 Determinação de acidez volátil.....	31
4.5.6 Análises cromatográficas	31
4.5.7 Análise estatística	32
4.5.8 Planejamento fatorial.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 PLANEJAMENTO FATORIAL	46
6 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, com produção estimada em julho de 2016 em torno de 96,3 milhões de toneladas, sendo que o estado do Paraná, produz 17,2 milhões de toneladas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2016). A versatilidade do grão da soja faz com que, em seu beneficiamento, ele seja empregado na alimentação humana e na animal (LOMAN; JU, 2016).

Durante a produção do farelo da soja, para aumentar a concentração de proteínas no produto final, empregam-se solventes, como etanol e água, no processo. O que permanece no líquido é uma mistura de carboidratos solúveis, fibras, proteínas, lipídeos e cinzas chamada de melaço de soja. Os principais açúcares encontrados no melaço são a sacarose, a estaquiase e a rafinose (SIQUEIRA et al., 2008; SILVA et al., 2012; LOMAN; JU, 2016).

O melaço de soja é considerado um resíduo de produção e sua degradação pode poluir o ar, pela formação de gases da matéria orgânica e os lençóis freáticos (LOMAN; JU, 2016). Em uma indústria de beneficiamento de soja na região metropolitana de Curitiba, Paraná, Brasil, há a produção diária de 650 toneladas (IMCOPA, 2016). Como é previsto um aumento na produção da soja em 2017 (USDA, 2016), é possível que o volume deste resíduo aumente.

Atualmente, o resíduo agroindustrial melaço de soja é empregado como substituinte ao combustível fóssil nas caldeiras e as cinzas restantes, ricas em potássio, são empregadas na agricultura. Entretanto, a utilização do melaço de soja como fonte de energia, além de gerar resíduos poluidores (gases resultantes da queima), é, também custo para a empresa, uma vez que devido a alta concentração de carboidratos se torna corrosivo e os açúcares se vitrificam nos equipamentos devido a alta temperatura (SCHOPF; ERBINO; PUVOGEL, 2014).

Sabe-se que estudos têm sido realizados para a valorização do resíduo melaço de soja e sua aplicação em produtos oriundos de processos bioquímicos, diminuindo o custo da matéria-prima original da indústria: a soja. Os principais produtos produzidos a partir do melaço de soja são: sorofolipídeos, polihidroxialcanoato (PHA), álcool etílico e ácido lático (LOMAN; JU, 2016).

O melaço da soja empregado neste trabalho é proveniente de uma indústria de beneficiamento de soja. Em sua estrutura encontram-se tanques e sistemas de

destilação necessários para a produção de álcool. Assim, este trabalho tem o objetivo de empregar o resíduo agroindustrial melaço de soja em um processo de fermentação devido a necessidade de gerar alternativas sustentáveis a baixo custo para a indústria, agregar valor econômico e tecnológico ao produto e reduzir o custo agregado da soja no produto final. O álcool produzido pela indústria pode ser empregado na planta industrial e a vinhaça restante pode ser utilizada em novos processos bioquímicos na indústria ou ser aplicado como fertilizante no solo para a produção da matéria-prima dos produtos principais da indústria, como a soja.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar as condições concentração de açúcar total inicial e concentração inicial de inóculo do processo fermentativo para obtenção de etanol a partir do melaço de soja empregando planejamento fatorial, visando diminuir este resíduo agroindustrial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer as condições ambientais dos processos de fermentação, valor de pH inicial, temperatura e agitação;
- Realizar as medidas de valor de pH e teor alcoólico e determinar as concentrações de acidez volátil e açúcar total;
- Otimizar as condições de processo: concentração de açúcar total inicial e concentração inicial de inóculo empregando o planejamento fatorial, metodologia superfície de resposta, para obtenção de etanol;
- Analisar estatisticamente os resultados obtidos pela otimização do processo e comparar ao resultado estimado pela metodologia de superfície de resposta e aos experimentos anteriores.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 SOJA

A soja (*Glycine max L.*) é uma leguminosa importada da China para o Brasil (EMBRAPA, 2016). A produção mundial de soja é estimada pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2016) em 326 milhões de toneladas, em julho de 2016, com aumento de 4,4% em relação ao ano anterior.

O Brasil ocupa a segunda posição mundial na produção da soja que é em torno de 96,3 milhões de toneladas, segundo pesquisa do IBGE de julho de 2016. A região sul do país fornece cerca de 35 milhões de toneladas, sendo que o Estado do Paraná produz 17,2 milhões de toneladas de grãos de soja (IBGE, 2016).

A soja é um grão muito versátil, após seu beneficiamento origina vários produtos empregados na indústria alimentícia e agroquímica. As principais aplicações da soja são na alimentação humana (óleo de soja refinado, farinha desengordurada de soja, carne de soja, leite de soja, tofu, lecitina de soja e shoyu) e na alimentação animal (rações) (LOMAN; JU, 2016).

Segundo o Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento (2014), o Brasil processa por ano cerca de 31 milhões de toneladas de soja, resultando em aproximadamente 6 milhões de óleo comestível e 23 milhões de toneladas de farelo proteico para o consumo animal.

Segundo a Embrapa (2014), o Brasil é auto-suficiente na produção da soja, exporta cerca de 42% da soja produzida e processa em torno de 51%. O processamento resulta na produção de óleos (19%) e farelos (77%). Os óleos produzidos alimentam o consumo interno (64%), porém o farelo é também um produto de exportação (56%).

Durante a industrialização da soja são produzidos os derivados, ou também chamados de co-produtos ou resíduos do beneficiamento da soja, que são ricos em carboidratos e que podem apresentar alto valor agregado após processamento adequado. Entre os derivados que apresentam alta concentração de carboidratos estão as cascas, okara e o melaço de soja (LOMAN; JU, 2016).

3.2 MELAÇO DE SOJA

O melaço de soja é um co-produto viscoso marrom e de sabor amargo-adocicado. Ele é gerado durante a produção do concentrado de proteína de soja e proteína isolada de soja, em que é necessário realizar a extração dos açúcares presentes no farelo de soja com uma mistura de etanol e água. Como resultado se obtêm farelo de soja concentrado e uma parcela líquida composta por etanol, água e açúcares. A porção de etanol é recuperada por evaporação e o subproduto gerado é o melaço de soja (SIQUEIRA et al., 2008; SILVA et al., 2012; LOMAN; JU, 2016).

O melaço de soja é constituído de carboidratos solúveis, proteínas (incluindo peptídeos e aminoácidos), lipídeos e cinzas. Os carboidratos solúveis mais encontrados no melaço são a sacarose (28%), estaquiase (18%) e rafinose (9%), em relação peso volume (LOMAN; JU, 2016).

O resíduo melaço de soja, até então, tem sido descartado na agricultura, devido a sua alta concentração de matéria orgânica. No entanto, a degradação dos componentes polui o ar e o excesso de nitrogênio pode contaminar os lençóis freáticos (SCHOPF; ERBINO; PUVOGEL, 2014).

Segundo Ezegiofor, Enebaku e Ogueke (2014), os resíduos orgânicos de origem da indústria agro-alimentar podem ser diminuídos em sua geração ou podem ser reciclados. Assim, empresas têm procurado agregar valor aos resíduos. Valorizar resíduos, segundo a Rede de Minimização e Reciclagem de Resíduos Agro-alimentares, é aumentar o valor técnico e/ou econômico de co-produtos ou resíduos que são gerados em diferentes indústrias agro-alimentares (PAP et al., 2014).

Em relação ao resíduo agroindustrial melaço de soja, em 2014, esta indústria produzia cerca de 650 toneladas por dia, 365 dias por ano. Como metodologia para o reaproveitamento, utilizava este co-produto como substituto de combustíveis fósseis em até 80% nas caldeiras da planta industrial. Este método de reaproveitamento faz com que as cinzas produzidas sejam reaproveitadas como fertilizantes, devido ao alto teor de potássio em sua composição. No entanto, a preparação do melaço de soja para o emprego como combustível também é custosa, uma vez que sua alta concentração de açúcares o torna corrosivo e os carboidratos podem vitrificar em altas temperaturas (SCHOPF; ERBINO; PUVOGEL, 2014).

Assim, o emprego como combustível natural não é a maneira mais adequada de reaproveitar os resíduos. Na busca por alternativas mais sustentáveis, pesquisas têm sido realizadas para buscar soluções de problemas relacionados ao tratamento final de resíduos, visando valorizar os resíduos agro-industriais e diminuir o custo de matérias-primas para os processos bioquímicos (LOMAN; JU, 2016).

O melaço de soja tem sido empregado, nestes estudos, como matéria-prima para os processos de produção de soforolipídeos, polihidroxialcanoato (PHA), álcool etílico e ácido lático (LOMAN; JU, 2016).

O resíduo agroindustrial melaço de soja já foi estudo para ser empregado como matéria-prima, com suplementação de ácido oleico, para a produção de soforolipídeos empregando a levedura *Candida bombicola*, em fermentação em batelada alimentada. Foram obtidas 21 g.L⁻¹ do produto, cerca de quatro vezes menos comparado ao substrato glucose. Acredita-se que a oxigenação do meio possa ter sido diminuída devido a viscosidade do melaço e que a utilização dos açúcares não tenha sido completa, uma vez que as leveduras não podem hidrolisar a estaquiose e a rafinose presentes no melaço de soja. Ainda assim, os autores consideram que a utilização do melaço de soja é viável, já que os custos das matérias-primas originais do meio (glicose como principal fonte de carbono e extrato de levedura e ureia como fontes de nitrogênio) são mais altos (SOLAIMAN et al., 2006; SOLAIMAN et al., 2007).

Polihidroxialcanoato (PHA) é um poliéster biodegradável produzido em grânulos internos de micro-organismos com potenciais aplicações como substitutos a polímeros de origem fóssil. A alternativa verde reduziria o custo da produção, e poderia ser aplicado como sistema de liberação de medicamentos, na medicina e na agricultura. Para reduzir o custo de produção, o emprego de matérias-primas baratas é essencial (LOMAN; JU, 2016).

Pesquisas que buscam a produção do polihidroxialcanotato (PHA) empregam como micro-organismos espécies diferentes de *Pseudomonas*, com destaque à *Pseudomonas corrugata*. Da mesma forma que as leveduras, esta bactéria também não é capaz de hidrolisar a estaquiose ou a rafinose. Outros autores empregaram espécies de *Bacillus*, em que selecionou-se a espécie que apresentava a maior habilidade de crescer e produzir polihidroxialcanoato (PHA) em condições aeróbicas e anaeróbicas e usar nitrato como aceptor final de elétrons

(realizar a denitrificação) (FULL et al, 2006; SOLAIMAN et al., 2006; LOMAN; JU, 2016).

O ácido láctico é formado a partir da vinhaça resultante da fermentação alcoólica do melaço de soja. Durante a produção de álcool, somente 47% dos carboidratos totais são consumidos pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, dando a vinhaça uma concentração final de cerca de 35% de carboidratos, sendo 22% de rafinose, 11% de estaquiose e 2% de galactose, também, 13,3% de proteínas, 27,8% de lipídeos, 9,2% de cinzas e 14,6% de fibras. Os micro-organismos estudados foram *Lactobacillus agilis* LPB 56, produzindo 50 g.L⁻¹ de ácido láctico com 80% de produtividade da vinhaça (KARP et al., 2011). Outros autores obtiveram ácido láctico diretamente do melaço de soja, utilizando *Lactobacillus salivarius*, nas condições otimizadas valor de pH 5,6 e temperatura 42 °C. Para reduzir o tempo de fermentação em 20 horas e aumentar a produção em 10%, os autores sugeriram a suplementação com extrato de levedura (MONTELONGO et al., 1993; LOMAN; JU, 2016).

3.3 PRODUÇÃO DE ÁLCOOL A PARTIR DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL MELAÇO DE SOJA

A produção de etanol de melaço de soja tem sido estudada apesar da baixa produtividade. Isto é devido à hidrólise, pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, da sacarose em glicose e frutose pela ação da enzima invertase, que também pode clivar a galactose da molécula de estaquiose, mas não pode metabolizar os açúcares restantes na estaquiose ou na rafinose. Devido a estas grandes concentrações, geralmente, não metabolizadas, os valores de produtividade para etanol são calculados em porcentagem teórica dos carboidratos consumidos (LOMAN; JU, 2016).

Métodos para a melhoria desta fermentação têm sido estudados, como, por exemplo, pela hidrólise da rafinose e estaquiose, gerando açúcares e sacarose por meio da ação de métodos físicos (pH e temperatura) ou enzimáticos (enzima α -galactosidase). Os métodos e condições de hidrólise variam de acordo com a matéria-prima e produto gerado, concentração de açúcares, grau de monomerização e geração de compostos inibidores como o ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural (LOMAN; JU, 2016).

Machado (1999) relatou 55% de produtividade de álcool utilizando melaço de soja, valor de pH 6,0, temperatura de 30 °C e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Silva et al. (2012) descreveram um aumento em 10% na produção de etanol empregando pré-tratamento do melaço de soja com a enzima α -galactosidase e *Saccharomyces cerevisiae* como micro-organismo produtor.

Além da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a bactéria *Zymomonas mobilis* também é utilizada para a produção de etanol. Letti et al. (2012) obtiveram a produção de 29,3 g.L⁻¹ de álcool em 200 g.L⁻¹ de melaço de soja. Esta maior concentração de etanol obtida é devido a degradação da estaquiose em rafinose, mas não da rafinose pela bactéria.

Segundo Sarkar, Ghosh, Bannerjee e Aikat (2012), vários países estão estudando a possibilidade de consumir a biomassa produzida por processos industriais ou atividades humanas e produzir bioetanol de segunda geração. Este biocombustível quando comparado com a gasolina apresenta potencial poluidor reduzido, aliado a necessidade de utilizar fontes de carbono não consumíveis. Ainda, segundo Sarkar, Ghosh, Bannerjee e Aikat (2012), estima-se que, por ano, resíduos e descartes de colheitas podem gerar até 491 bilhões de litros de bioetanol.

Segundo Renewable Fuels Association (RFA) (2016), em 2015 o maior produtor de etanol combustível no mundo foram os Estados Unidos com cerca de 14,7 milhões de galões de etanol, seguido do Brasil com produção anual de cerca de 7,1 milhões de galões de etanol.

Nos Estados Unidos, a principal matéria-prima para produção de etanol é o milho, porém de acordo com o Relatório da Indústria do Etanol emitido pela Renewable Fuels Association, em janeiro de 2016, de um total de 199 biorefinarias em operação, apenas nove utilizam bagaço de cana-de-açúcar, soro de queijo, resíduos de madeiras, de processos cervejeiros, de processos de bebidas e de produção de açúcar.

Já, o Brasil ocupa o segundo lugar na produção mundial de etanol e foi o pioneiro no uso de etanol como combustível, com o programa Pró-álcool, em 1975. A base deste programa foi a industrialização da cana-de-açúcar, desta forma a matéria-prima majoritária para a produção de etanol no Brasil continua a ser a cana-de-açúcar (LEITE; CORTEZ, 2014).

Segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (2016), em fevereiro de 2016, o Brasil contava com 357 plantas autorizadas para

produção de álcool, dentre estas apenas 2,9% utilizavam outras fontes que não a cana-de-açúcar.

O etanol é produzido por meio da fermentação alcoólica. A fermentação alcoólica é um processo anaeróbio de transformação de açúcares, como glicose, sacarose ou frutose, em etanol e gás carbônico.

Lima, Basso e Amorim (2001) descrevem que a fermentação alcoólica é uma sequência de doze reações em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Estas enzimas sofrem ações de diversos fatores (nutrientes, minerais, vitaminas, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, valor de pH, temperatura e outros), alguns estimulam e outros reprimem a ação enzimática, afetando o desempenho do processo fermentativo.

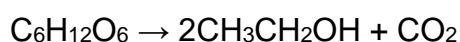
As leveduras, principalmente a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, são os micro-organismos mais adaptados e utilizados na fermentação industrial, usam a glicólise como principal rota para catabolizar açúcares (LIMA, BASSO, AMORIM, 2001).

3.4 BIOQUIMISMO DA FORMAÇÃO DE ETANOL

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são micro-organismos aeróbicos facultativos, portanto os produtos finais de metabolização dependem das condições ambientais em que a levedura se encontra. Geralmente, em aerobiose, os açúcares absorvíveis são, em sua maioria, metabolizados e formam biomassa, gás carbônico e água, e, em anaerobiose formam etanol e gás carbônico (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

A formação do álcool pela levedura tem a função de gerar energia (adenosina trifosfato - ATP) que será empregada no metabolismo intracelular necessário para a manutenção da vida, crescimento e multiplicação (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

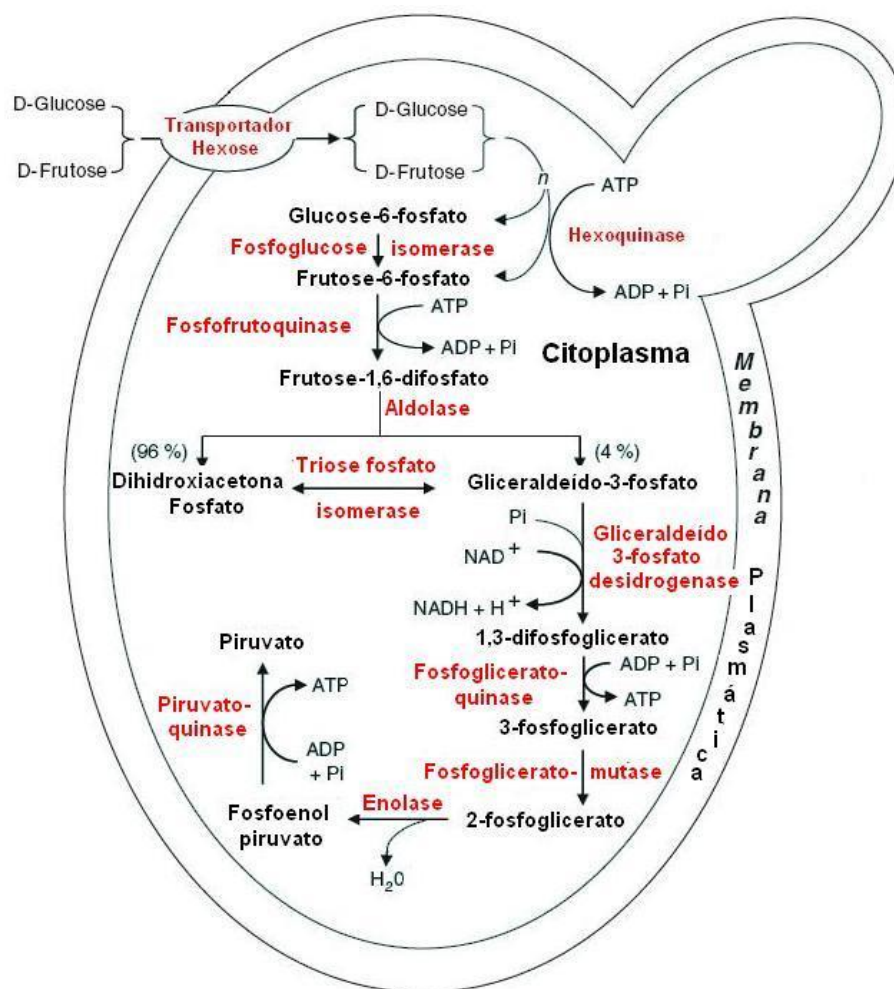
O processo bioquímico, apresenta a estequiometria simplificada de acordo com a equação a seguir:



Nas células de leveduras, as hexoses são transportadas para o seu interior por difusão facilitada. No citoplasma, estão presentes as hexoquinases que realizam a fosforilação da glicose e da frutose, gerando glicose 6-fosfato e frutose 6-fosfato. Em seguida, a enzima fosfoglicose isomerase converte, então, a glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato. As moléculas de frutose-6-fosfato são fosforiladas, por meio da ação da enzima fosfofrutoquinase em frutose-1,6-difosfato. Então, a enzima aldose cliva as moléculas de frutose-1,6-difosfato em frutose-6-fosfato, gerando duas trioses: a dihidroxiacetona-fosfato e a gliceraldeído-3-fosfato (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

As moléculas de dihidroxiacetona-fosfato são transformadas em gliceraldeído-3-fosfato pela ação de isomerasas. A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase converte as moléculas de gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-difosfoglicerato. Posteriormente, a fosfogliceratoquinase transforma as moléculas de 1,3-difosfoglicerato em 3-fosfoglicerato e a fosfoglicerolmutase converte 3-fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato. Esta molécula é, então, desidratada pela enolase gerando fosfoenolpiruvato que é fosforilado pela enzima piruvato quinase, terminando a cadeia de reações em piruvato (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

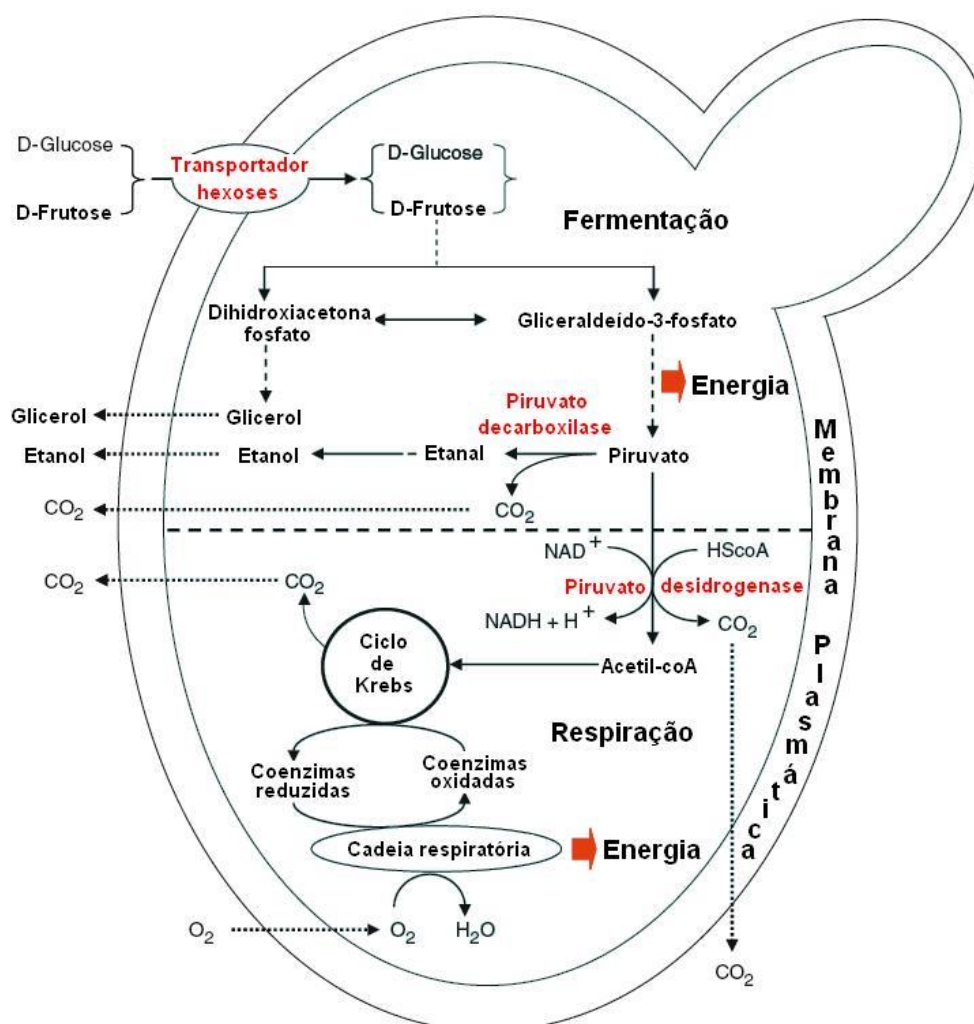
FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA REAÇÃO BIOQUÍMICA GLICÓLISE EM LEVEDURAS



FONTE: MORENO-ARRIBAS; POLO (2009).

Em leveduras, a molécula de piruvato pode seguir duas rotas metabólicas. Uma delas ocorre na presença de oxigênio, em que o piruvato é transformado em acetil-coenzima A (acetil-coA) e dióxido de carbono, e por meio do ciclo de Krebs, há completa transformação da acetil-coenzima A em moléculas de energia (ATP) e dióxido de carbono. Porém, na ausência de oxigênio e em altas concentrações de açúcares fermentescíveis, as moléculas de piruvato são transformadas em etanal pela ação da enzima piruvato descarboxilase e o etanal, por sua vez, é reduzido em etanol. Esta via anaeróbia é chamada de fermentação alcoólica (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS REAÇÕES DE RESPIRAÇÃO CELULAR E FERMENTAÇÃO EM CÉLULAS DE LEVEDURAS



FONTE: MORENO-ARRIBAS; POLO (2009).

Além da formação do etanol, também há a produção do glicerol, ácidos orgânicos (ácidos succínico, pirúvico, etc), álcoois superiores, acetaldeído, acetoína, butilenoglicol e outros compostos, além da formação de biomassa. Autores estimam que 90% dos açúcares presentes em um mosto sejam metabolizados em etanol e o restante em outros produtos que não o etanol. Por isto, os valores expressos de produtividade em etanol são relativos ao açúcar consumido (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

3.5 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Os autores também destacam a importância da preparação do inóculo para a fermentação alcoólica. O preparo do inóculo consiste no crescimento e adaptação das células da levedura selecionada ao mosto para que haja uma diminuição do tempo da fase lag da fermentação alcoólica, como também o aumento do volume de células até o número necessário para o sucesso do processo fermentativo (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

O processo de fermentação alcoólica se inicia tão logo ocorre a mistura entre o inóculo e o mosto. Três fases podem ser descritas de acordo com as características percebidas (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). A primeira fase é descrita como fase lag, ou fase preliminar, que é caracterizada pela multiplicação celular intensa, pequena elevação de temperatura e pequeno desprendimento de dióxido de carbono, sua duração depende do sistema de fermentação e do volume do inóculo (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). A segunda fase, descrita como tumultuosa é percebida pelo desprendimento intenso de dióxido de carbono, formação de espuma, como consequência da existência de um número suficiente de células para metabolizar os açúcares fermentescíveis presentes no mosto. Esta fase é a que possui maior duração, a temperatura eleva-se rapidamente, a densidade do mosto reduz e a concentração de álcool e ácidos presentes no mosto aumentam (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). A última fase é chamada de fase complementar, é caracterizada pela diminuição do desprendimento de dióxido de carbono, por menor movimento do líquido e diminuição da temperatura. Nesta fase, a concentração de açúcares fermentescíveis é mínima e ocorre a formação de álcoois superiores (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Ainda, segundo Lima, Basso e Amorim (2001), os principais fatores que influenciam o processo fermentativo são: o micro-organismo empregado, a nutrição mineral e orgânica (fontes de carbono, nitrogênio, minerais e vitaminas), a temperatura, valor de pH do meio, presença de inibidores da fermentação, concentração de açúcar, concentração de inóculo, contaminação bacteriana, uso de antissépticos e antibióticos. Alterações destes fatores pode aumentar a velocidade ou retardar a fermentação alcoólica.

Segundo Antonangelo (2012) algumas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* foram selecionadas de indústrias brasileiras por apresentarem adaptação aos

processos fermentativos empregados e pela sua alta eficiência. Dentre estas destacam-se as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* SA-1 e BG-1, selecionadas da indústria Copersucar de Santa Adélia e usina de Barra Grande, no Estado de São Paulo, respectivamente, e *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e PE-02, selecionadas nas usinas de álcool da Fermentec de Catanduva e da Pedra (Antonangelo, 2012; Reis, 2011).

Junior (2006) e Angeloni (2009) utilizaram as leveduras comerciais *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, BG-1, PE-02, FLEISHMANN e leveduras não comerciais para verificar a ação do transportador de sacarose, da enzima invertase e do alumínio no processo fermentativo do caldo de cana. Junior (2006) e Angeloni (2009) concluíram que não houve diferença significativa de rendimento de teor alcoólico entre as leveduras comerciais.

Duarte et al. (2010) empregaram as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, VR-1, PE-02, BG-1, SA-1 e outras leveduras selecionadas para a fermentação do suco de framboesas. Dentre as leveduras comerciais, a *Saccharomyces cerevisiae* VR-1 e a BG-1 apresentaram produção alcoólica de 71,5 g.L⁻¹, a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* PE-02 apresentou a segunda maior produção com 69,34 g.L⁻¹ e as leveduras comerciais *Saccharomyces cerevisiae* SA-1 e CAT-1 produziram as concentrações de 68,92 e 66,78 g.L⁻¹, respectivamente.

Oliveira et al. (2011) relatou a fermentação de suco de cagaita com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e UFLA CA11 livres e imobilizadas, como resultado obtiveram que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA11 imobilizada possui maior produção alcoólica, com 94,9 g.L⁻¹ de etanol.

Salvato (2010) estudou as leveduras comerciais *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, BG-1 e HCJ-003 para fermentar melaço de cana misturado a caldo de cana. Os resultados deste estudo mostraram que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* HCJ-003 possuiu rendimento médio de 87,31%, enquanto que a *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 apresentou rendimento de 84,02%. Já, Halabi (2010), por meio de fermentação de caldo de cana pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PE-02 e CAT-1, obteve rendimentos fermentativos de 90,5% e 88,4%, respectivamente.

Alexandrino (2012) realizou a fermentação de melaço de cana misturado com caldo de cana utilizando leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PE-02, CAT-1 e SA-1. Ao final de 8 ciclos de fermentação, as leveduras comerciais *Saccharomyces*

cerevisiae PE-02 e CAT-1 apresentaram valores de rendimento fermentativo próximos, 95,37% e 94,79% respectivamente.

Costa et al. (2014) utilizaram as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LBM-1, CAT-01 e PE-02, além de *Kluyveromyces marxianus* UFV-3, ATCC 8554 e CCT 4086 para produção de etanol em solução de glicose e bagaço de cana pré-tratado. Como resultados obtiveram que leveduras *Kluyveromyces marxianus* possuíram melhor crescimento em temperaturas altas (45°C), porém a levedura *Saccharomyces cerevisiae* teve maior tolerância a concentrações de etanol no meio (8% v/v). A levedura que apresentou melhor rendimento de etanol em meio de glicose foi *Saccharomyces cerevisiae* LBM-1 com 0,68 g de etanol por grama de glicose, a 37°C. Em temperatura de 42°C, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 apresentou melhor rendimento com 0,59 g de etanol por grama de açúcar. Já, no meio de bagaço de cana, as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LBM-1, UFV-3 e ATCC 8554, a 37°C, apresentaram rendimentos semelhantes, cerca de 0,28 gramas de etanol por grama de celulose, e, na temperatura de 42°C, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Visando baixo custo de implantação e a utilização da infra-estrutura já presente na planta industrial fornecedora do substrato melaço de soja, bem como propor à empresa uma alternativa de reaproveitamento de resíduos mais sustentável e que agregue valor ao melaço de soja, o presente trabalho tem como meta a produção de álcool a partir do melaço de soja.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRO-ORGANISMO

Neste trabalho foi empregada a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1, adquirida da LNF Latino Americana.

A empresa fornecedora de matéria-prima melaço de soja possuía como ativo e não pretendia adquirir novos micro-organismos.

4.2 MATÉRIA-PRIMA

O melaço de soja para o preparo do meio para a adaptação do inóculo e para o mosto foi disponibilizada pela indústria IMCOPA, município de Araucária, Avenida das Araucárias nº5899, CEP: 83707-752.

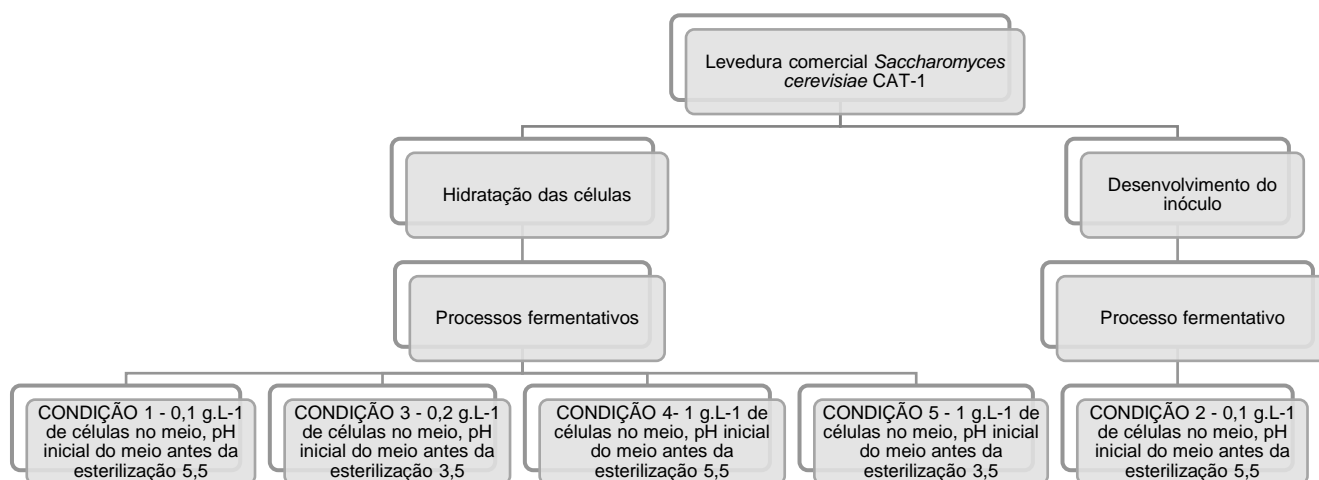
4.3 PREPARO DO INÓCULO

4.3.1 Hidratação das células

As células liofilizadas da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 foram hidratadas em frasco de Erlenmeyer com água destilada estéril em volume adequado a quantidade em gramas da levedura a ser empregada. Os frascos de Erlenmeyer foram mantidos em agitador incubador (TECNAL, modelo TE-421) a 130 rpm, 40 °C, por 60 minutos.

Após a hidratação, as células de levedura foram adicionadas para iniciar os processos ou utilizadas para o desenvolvimento do inóculo, conforme FIGURA 3.

FIGURA 3. FLUXOGRAMA DO DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA DESTE TRABALHO



FONTE: O autor (2016).

4.3.2 Desenvolvimento do inóculo

Para o desenvolvimento do inóculo, a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 foi ativada e o inóculo foi preparado em duas etapas com concentrações adequadas de melaço de soja. A água destilada e os meios empregados foram esterilizados em autoclave vertical marca Phoenix por calor úmido, a temperatura de 121°C e sob pressão de 1 atm, por tempo de acordo com o volume de meio e a capacidade total do frasco.

Para a ativação, 0,01 g de células secas da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 foi transferida para um frasco de Erlenmeyer de 50 mL de capacidade contendo 10 mL de meio YEPD (10 g.L⁻¹ extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ peptona, 20 g.L⁻¹ glicose). O valor de pH do meio YEPD foi ajustado anteriormente à esterilização para $5,5 \pm 0,2$. O frasco de Erlenmeyer contendo o meio inoculado foi mantido em agitador incubador a 130 rpm, 28 °C, por 18 horas.

Para a adaptação das células ao meio melaço de soja, as células crescidas em meio YEPD foram transferidas para um frasco de Erlenmeyer de 500 mL de capacidade contendo 100 mL de melaço de soja diluído, em quantidade suficiente para que a concentração final fosse de 6% (p/v). O valor do pH inicial foi medido e mantido em $5,5 \pm 0,2$. O frasco inoculado foi mantido em agitador incubador nas mesmas condições ambientais, por 24 horas. Após este período, as células e o meio

foram transferidos para um frasco de Erlenmeyer de 1000 mL de capacidade contendo melaço de soja diluído em concentração suficiente para que em 250 mL de meio de adaptação, a concentração de melaço de soja fosse de 8% (p/v), valor de pH inicial $5,5 \pm 0,2$. O frasco contendo o meio inoculado foi mantido em agitador incubador a 130 rpm, 28 °C, 24 horas.

Os valores de pH inicial dos meios empregados no desenvolvimento do inóculo foram ajustados utilizando solução aquosa de hidróxido de sódio 5 mol.L⁻¹ ou ácido sulfúrico P.A., marca Synth.

As células de levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 hidratadas ou obtidas após o desenvolvimento do inóculo foram transferidas para reator de 12 litros de capacidade total, contendo mosto constituído de melaço de soja diluído em concentrações adequadas, conforme verificado na FIGURA 3.

A mensuração do crescimento celular durante o desenvolvimento do inóculo foi determinada por gravimetria.

4.4 PROCESSOS FERMENTATIVOS

Os processos fermentativos foram realizados em frascos de 12 litros de capacidade total, contendo 6,4 litros de mosto melaço de soja diluído em água destilada. Os mostos dos processos foram elaborados com as massas de melaço de soja transcritas na TABELA 1. Após a pesagem das massas de melaço de soja descritas, em balança semi-analítica (Digi-tron, classe III), o melaço de soja foi diluído em água destilada e, após a diluição, o mosto teve seu volume ajustado para 6400 mL e foi transferido para reator de 12 litros.

TABELA 1 - DESIGNAÇÃO DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS, MASSA DE MELAÇO DE SOJA EMPREGADA NO MOSTO E PERCENTUAL DE MELAÇO DE SOJA NOS MOSTOS

Processo fermentativo	Massa de melaço de soja (kg)	Quantidade de melaço de soja no mosto % (p/v)
CONDIÇÃO 1	1,68	26,25
CONDIÇÃO 2	2,32	36,25
CONDIÇÃO 3	2,32	36,25
CONDIÇÃO 4	1,15	18,0
	1,44	22,5
	1,73	27,00
	2,01	31,41
CONDIÇÃO 5	1,15	18,0
	1,44	22,5
	1,73	27,00
	2,01	31,41

FONTE: O autor (2016).

NOTA: Os processos fermentativos estão designados pelo número do gráfico que os representam no item resultados e discussão.

Nos processos denominados de CONDIÇÃO 1, CONDIÇÃO 3 e CONDIÇÃO 4, os mostos tiveram seu valor de pH inicial mantidos em 5,5 anteriormente à esterilização. Para os processos CONDIÇÃO 2 e CONDIÇÃO 5, o pH do mosto foi ajustado para $3,5 \pm 0,2$ utilizando solução de ácido sulfúrico P.A., marca Synth. Os meios empregados foram esterilizados em autoclave vertical marca Phoenix por calor úmido, a temperatura de 121°C e sob pressão de 1 atm, por 45 minutos. Após a esterilização, os meios foram resfriados a temperatura ambiente e o pH foi corrigido para $5,5 \pm 0,2$ empregando solução aquosa de hidróxido de sódio 5 mol.L^{-1} estéril.

Os processos fermentativos, denominados de CONDIÇÃO 1, 3, 4 e 5 foram iniciados com as células hidratadas da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e, somente, o processo denominado CONDIÇÃO 2, foi iniciado com células obtidas após o desenvolvimento do inóculo. As concentrações de células iniciais empregadas foram de 0,1; 0,2 e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ para os processos denominados CONDIÇÃO 1 e 2, CONDIÇÃO 3 e CONDIÇÃO 4 e 5, respectivamente, conforme FIGURA 3.

Amostras foram retiradas dos processos no tempo zero hora, durante e ao final da fase tumultuosa da fermentação alcoólica. As amostras coletadas foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos em centrífuga Sigma, modelo 2-3, para a separação das células do líquido fermentado. O sobrenadante foi utilizado para a determinação das concentrações de açúcar total, acidez volátil, teor alcoólico e medida de valor de pH.

4.5 ANÁLISES

4.5.1 Determinação da concentração celular

Para a determinação da concentração celular pelo método gravimétrico, foram centrifugados 4 mL de amostra a 10.000 rpm por 10 minutos. As células precipitadas foram lavadas até a remoção completa do meio e secas em liofilizador, marca Operon, até peso constante. As células secas foram pesadas em balança analítica Bioprecisa modelo FA2104N. A determinação da concentração celular foi calculada segundo a equação de Hiss (2001) e cada amostra foi analisada em quintuplicada.

$$X_t = X.V^{-1}$$

Em que: X_t = concentração de células secas (g.L^{-1}) no tempo t , X = células secas (g) e V = volume de amostra (L).

4.5.2 Determinação de açúcar total

As análises de açúcares totais no resíduo agroindustrial melaço de soja foram realizadas pelo método titulométrico de Eynon Lane, conforme descrito por Brasil (2005).

4.5.3 Medição de valor de pH

Para todas as amostras coletadas durante os cultivos realizados, o valor de pH do cultivo foi determinado em potenciômetro de bancada MS Tecnapon Instrumentação, modelo mPA-120 e sensor Sensoglass devidamente calibrado, à temperatura ambiente (entre 20 °C e 25 °C).

4.5.4 Medição de teor alcoólico

A determinação de teor alcoólico foi realizada conforme o Manual Operacional de Bebidas e Vinagres, caderno de bebidas fermentadas, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2005).

As amostras dos processos fermentativos foram destiladas em Microdestilador de álcool Tecnal, modelo TE-012, e o líquido proveniente foi analisado em densímetro digital Anton Paar, modelo DMA 4500, o qual verifica a densidade relativa e a converte em teor alcoólico.

4.5.5 Determinação de acidez volátil

A acidez volátil foi determinada conforme o Manual Operacional de Bebidas e Vinagres, caderno de bebidas fermentadas, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2005).

4.5.6 Análises cromatográficas

A identificação e quantificação dos açúcares estaquiose, rafinose, sacarose, glucose, galactose e frutose foram realizados por cromatografia líquida de alta eficiência em cromatógrafo Agilent, modelo 1200, equipado com bomba quaternária Agilent 1200, com injetor automático, acoplado ao detector RID.

O protocolo de análise utilizado foi desenvolvido e validado pela indústria IMCOPA. A pré-coluna empregada nas análises foi Supelcogel Ca 50 x 4,6 mm e a coluna Supelcogel Ca 300 x 7,8 mm. O volume de injeção utilizado foi de 5 μ L.

Nas análises, foram empregados os padrões externos estaquiose, rafinose, sacarose, glucose, galactose e frutose. As soluções destes carboidratos foram elaboradas pela dissolução dos açúcares em solução de ácido sulfúrico 0,008 mol.L⁻¹.

Os compostos presentes nas amostras foram identificados pela comparação com os tempos de retenção das amostras com os padrões.

A quantificação dos teores de estaquiose, rafinose, sacarose, glucose, galactose e frutose foram realizadas por meio da comparação das curvas de calibração internas que foram compostas, para cada carboidrato, por sete pontos com concentrações definidas.

4.5.7 Análise estatística

Para as determinações de concentração de açúcar total, concentração de acidez volátil, valor de pH e teor alcoólico foram realizadas análises em triplicata e com os resultados calculou-se as médias e desvios padrões.

As comparações múltiplas das médias obtidas para os parâmetros analisados foram realizadas pelo método de Tukey, ajustado para que o nível de confiança fosse de 95%. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo em todos os testes.

4.5.8 Planejamento fatorial

Planejamento experimental empregando a metodologia de superfície de resposta foi realizado para a verificação do efeito dos fatores concentração inicial de açúcar (g.L^{-1}) e concentração inicial de células (g.L^{-1}) na produção de álcool pela levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e para a otimização da produção de álcool. O planejamento experimental, contendo duas variáveis, concentração inicial de açúcar e concentração inicial de células, testadas em cinco níveis com cinco replicatas no ponto central (TABELA 2), foi gerado e analisado pelo *software* Minitab 17.1.0.

TABELA 2 - VARIÁVEIS E SEUS NÍVEIS CODIFICADOS E REAIS NA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Variáveis	Níveis				
	- 1.41	- 1	0	+ 1	+ 1.41
Concentração inicial de inóculo (g.L^{-1})	1,91	4,5	10,75	17	19,59
Concentração inicial de açúcares (g.L^{-1})	79,29	100	150	200	220,71

FONTE: O autor (2016)

A resposta teor de etanol foi medida e sua relação com as variáveis testadas foi determinada pela equação de segunda ordem.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{ij=1}^n \beta_{ij} X_i X_j$$

Em que, Y é a resposta teor de etanol; β_0 é uma constante; β_i , coeficientes lineares; β_{ii} , coeficientes quadráticos; β_{ij} , coeficientes de interação; X, valores reais das variáveis testadas.

Os efeitos lineares, quadráticos e de interação foram avaliados. A significância estatística dos coeficientes foram avaliados pelo teste *t* de Student. A adequação do modelo de regressão foi avaliada pelo coeficiente de determinação (R^2). O gráfico de superfície de resposta foi criado para demonstrar os efeitos das variáveis no teor alcoólico.

O experimento para verificação dos valores otimizados para as variáveis concentração inicial de células e concentração inicial de açúcar fornecidos pelos modelos foram realizados em triplicata.

O experimento para a verificação dos parâmetros concentração inicial de açúcar total e concentração inicial de inóculo foi conduzido com 1200 mL de mosto em cada frasco de Erlenmeyer de 2000 mL de capacidade total. O mosto foi elaborado individualmente, para cada frasco. O melaço de soja foi pesado conforme quantidades descritas na TABELA 3. O meio teve seu valor de pH ajustado para 3,5 antes da esterilização empregando ácido sulfúrico P.A., marca Synth. Os meios empregados foram esterilizados em autoclave vertical marca Phoenix por calor úmido, a temperatura de 121°C e sob pressão de 1 atm, por 45 minutos. Após a esterilização, os meios foram resfriados a temperatura ambiente e o pH foi corrigido para $5,5 \pm 0,2$ empregando solução aquosa de hidróxido de sódio 5 mol.L⁻¹ estéril.

TABELA 3 - CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR TOTAL INICIAL g.L⁻¹, PORCENTAGEM DE MELAÇO DE SOJA NO MOSTO %(p/v) E MASSA DE MELAÇO DE SOJA PESADO

Concentração inicial de açúcar total (g.L ⁻¹)	Porcentagem de melaço de soja %(p/v)	Massa de melaço de soja pesado (g)
79,29	21,37	256,43
100	26,95	323,42
150	40,43	485,12
200	53,90	646,83
220,71	59,48	713,81

FONTE: O autor (2015)

As quantidades de levedura do experimento foram inoculadas nos frascos conforme delineamento e mantidos em estufa estática, à 28°C, até a finalização da fase tumultuosa da fermentação alcoólica. Amostras foram retiradas no início (tempo zero) e ao fim do processo de fermentação para a determinação de concentração de açúcar total e teor alcoólico.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente e comparados ao estimado pela metodologia de superfície de resposta e aos experimentos anteriores.

Após a análise dos resultados, o meio para as condições otimizadas de concentração inicial de açúcar total e concentração inicial de inóculo foi elaborado conforme descrito para os experimentos anteriores. Os frascos inoculados foram mantidos em estufa estática, à 28°C, até a finalização da fase tumultuosa da fermentação alcoólica. Amostras foram retiradas no início e ao final da fase tumultuosa da fermentação alcoólica para a análise da concentração de açúcar total residual e teor alcoólico.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O melaço de soja e outras matérias-primas naturais fornecem meios de processo que não apresentam constituição centesimal definida. Schmidell et al. (2001) ao descreverem meios oriundos de matérias-primas naturais, como caldos e melaços, apontam que as composições químicas destes meios são afetadas por fatores como solo, variedade do vegetal, safra, clima, processamento e estocagem.

Segundo Romão et al. (2012) o melaço de soja contém altas concentrações de nitrogênio, macronutrientes, micronutrientes e 53% de carboidratos. Segundo Machado (1999) a composição dos carboidratos do grão de soja se faz principalmente por sacarose, estaquiose, rafinose, glicose, frutose, melibiose, galactose, ramnose e maltopentose.

Siqueira et al. (2008) caracterizaram o melaço de soja com relação aos seus componentes e os resultados obtidos estão relacionados na TABELA 4.

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS AÇÚCARES NO MELAÇO DE SOJA

Componente	% em base seca
Carboidratos totais	57,3
Sacarose	28,4
Estaquiose	18,6
Rafinose	9,68
Galactose	0,254
Glicose	0,243
Frutose	0,127
Lactose	-
Lipídeos	21,2
Proteínas	9,44
Cinzas	6,36
Fibras	5,7

FONTE: Adaptada de SIQUEIRA et al. (2008)

O melaço de soja utilizado apresentava concentração inicial de açúcar total de 30,92 gramas de açúcar total em 100 gramas de melaço de soja.

Para a realização dos processos fermentativos visando o reaproveitamento do resíduo agroindustrial melaço de soja para a produção de etanol, em que o

consumo da fonte de carboidratos deve ser maximizado, foram estabelecidas as variáveis pH, temperatura e agitação de acordo com os dados obtidos da literatura.

O valor de pH do meio ideal para a produção otimizada de etanol deve ser limitado entre 5,0 e 5,5 (NARENDRANATH; POWER, 2005). O pH do meio influencia o processo fermentativo evitando contaminações ou desvios de rotas metabólicas assim como promove a rápida formação do produto, mas que segundo Machado (1999), valores de pH abaixo de 3,5 inibem a formação de etanol. Em processos fermentativos, onde não há o controle de pH, este autor, em concordância com Narendranath e Power (2005), determinaram que a faixa ideal de pH do meio para a produção de etanol deve ser em torno de 5,0 a 6,0.

Em relação à temperatura, Machado (1999) aponta que a faixa de 30 °C a 40 °C é mais indicada para a produção de etanol e, segundo Ferrari (2013), a faixa ótima é entre 26 °C e 35 °C.

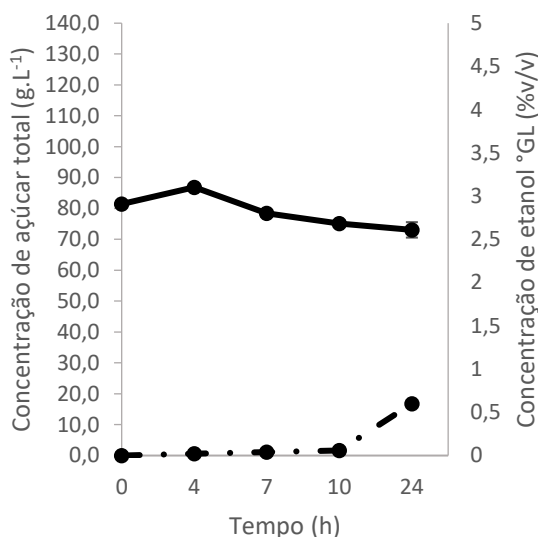
Santos et al (2013), para a obtenção de etanol em processos fermentativos com fontes diversas de carbono e nitrogênio empregando as leveduras comerciais *Saccharomyces cerevisiae* CATANDUVA-1 (CAT-1) e *Saccharomyces cerevisiae* PEDRA-2 (PE-02) utilizaram a temperatura de 30 °C. Brown et al. (2013) conduziram fermentações empregando mosto de cana-de-açúcar e leveduras comerciais, como *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e PE-02, e não-comerciais e temperatura de 33 °C para a produção de etanol.

Desta maneira, foram fixadas as condições ambientais para a condução de processos de formação de etanol, utilizando o resíduo agroindustrial melaço de soja, 5,5 de valor de pH inicial e 28 °C de temperatura. Os processos foram conduzidos sem o emprego de agitação com o intuito de poder reproduzir o processo fermentativo em escala industrial de acordo com a estrutura pré-existente na indústria fornecedora da matéria-prima, melaço de soja, e priorizando o menor custo de implantação do processo. Também, evitou-se empregar diluições excessivas do resíduo agroindustrial e suplementos ao meio reacional.

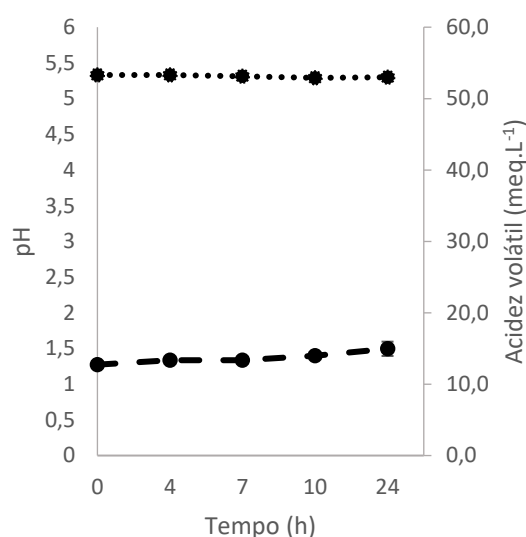
O meio do processo foi inoculado com concentração inicial de 0,1 g.L⁻¹ de células da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1), previamente hidratadas com água destilada estéril, e os resultados estão apresentados no GRÁFICO 1.

GRÁFICO 1 - CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR TOTAL (g.L^{-1}), TEOR ALCOÓLICO ($^{\circ}\text{GL}$) À 20°C , pH E CONCENTRAÇÃO DE ACIDEZ VOLÁTIL (meq.L^{-1}) EM FUNÇÃO DO TEMPO DO PROCESSO EMPREGANDO MOSTO DE MELAÇO DE SOJA E INOCULADO COM CONCENTRAÇÃO INICIAL DE $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ DE CÉLULAS DA LEVEDURA COMERCIAL *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1).

(a)



(b)



FONTE: O autor (2015).

NOTA: Resultados estão representados no gráfico:

- (a) Concentração de açúcar total pela linha contínua (_____)
 Teor alcoólico pela linha tracejada e pontilhada (- . - . - .)
 (b) Valor de pH pela linha pontilhada (.)
 Concentração de acidez volátil pela linha tracejada (- - - -)

Ao conduzir o processo fermentativo foi possível notar uma dificuldade em obter amostras homogêneas, conforme observado nos resultados de açúcar total apresentados no GRÁFICO 1 (a). A concentração de açúcar total inicial no meio foi em torno de 80 g.L^{-1} , após 4 horas de processo 85 g.L^{-1} e no término 74 g.L^{-1} . Após 24 horas foram obtidos, em torno de $0,6^{\circ}\text{GL}$ à 20°C (%v/v) de etanol. O valor de pH do meio e a concentração de acidez volátil permaneceram semelhantes ao inicial, GRÁFICO 1b, de 5,3 e em torno de 15 meq.L^{-1} , respectivamente.

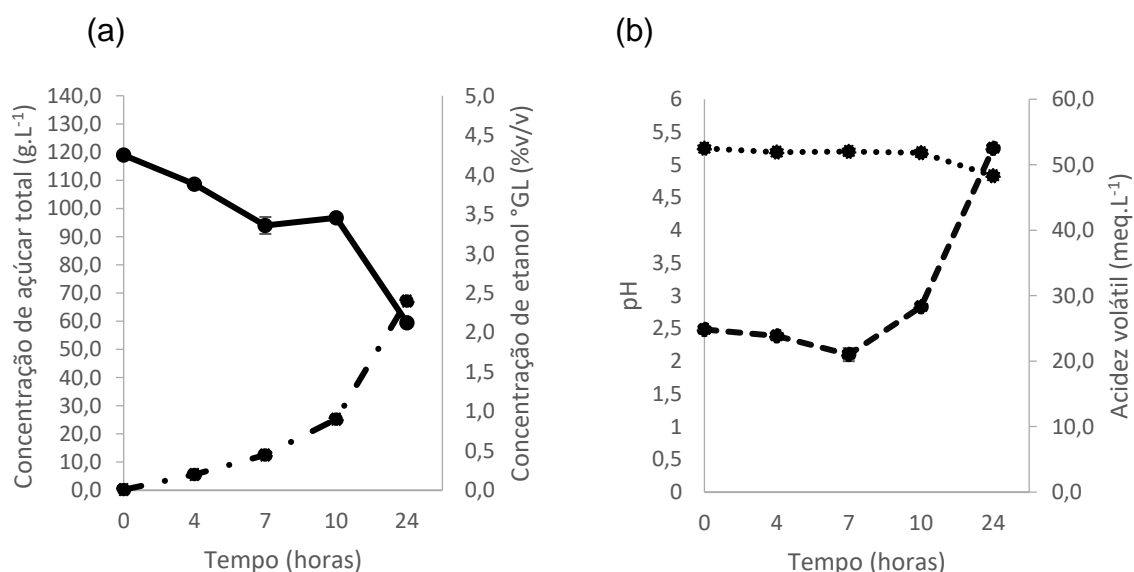
Na literatura é descrita a hidrólise ácida como forma de aumentar a quantidade de açúcares redutores, portanto fermentescíveis, no melaço de soja. Machado (1999) hidrolisou melaço de soja utilizando ácido clorídrico e sulfúrico. O autor reduziu o pH do meio de processo com os ácidos citados para 3,0, esterilizou o meio por 15 minutos a 121°C , e aumentou o valor de pH para faixa entre 5,0 e 6,0. O autor verificou que o melaço de soja hidrolisado obteve $47,22 \text{ g.L}^{-1}$ de açúcares

redutores, enquanto que a amostra de melaço de soja que não passou por tratamento ácido apresentou 1,97 g.L⁻¹ de açúcares redutores.

Romão et al. (2012) também testaram diferentes ácidos, como o ácido sulfúrico, hidrocloreídrico e nítrico, para hidrolisar o melaço de soja visando a obtenção de álcool. Para estes autores, o ácido nítrico favoreceu a fermentação alcoólica.

Assim, com a intenção de melhorar a homogeneidade do mosto e aumentar a disponibilidade de açúcares redutores, o mosto de melaço de soja foi acidificado previamente à esterilização, conforme material e métodos 4.4, e empregado em outros processos também iniciados com 0,1 g.L⁻¹ de células da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1), previamente adaptadas em meio constituído de melaço de soja diluído, e os resultados estão representados no GRÁFICO 2.

GRÁFICO 2 - CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR TOTAL (g.L⁻¹), TEOR ALCOÓLICO (°GL) À 20 °C (a), pH e CONCENTRAÇÃO DE ACIDEZ VOLÁTIL (meq.L⁻¹) (b) NOS PROCESSOS INICIADOS COM 0,1 g.L⁻¹ DE CÉLULAS ADAPTADAS EM MELAÇO DE SOJA DA LEVEDURA COMERCIAL *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO (horas).



FONTE: O autor (2015).

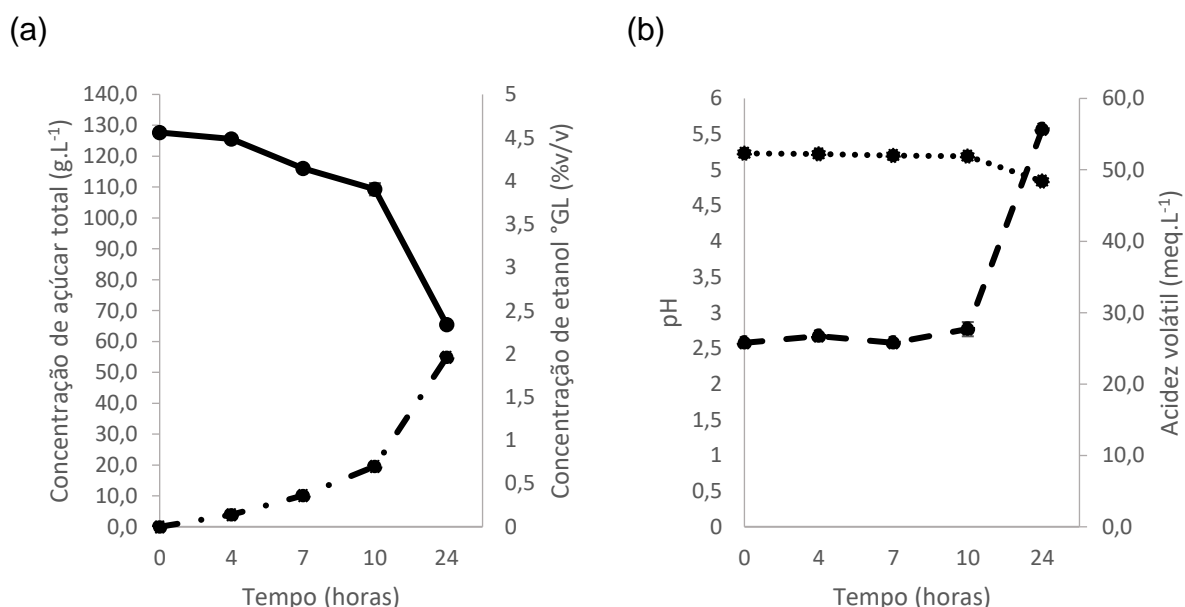
NOTA: Resultados estão representados no gráfico:

- (a) Concentração de açúcar total pela linha contínua (_____)
- Teor alcoólico pela linha tracejada e pontilhada (_ . _ . _ .)
- (b) Valor de pH pela linha pontilhada (.)
- Concentração de acidez volátil pela linha tracejada (- - - -).

A concentração inicial de açúcar total foi de aproximadamente 120 g.L⁻¹, e após 24 horas foram consumidos 60 g.L⁻¹ e obtidos em torno de 2,4 °GL à 20 °C (%v/v) de teor alcoólico.

Observa-se pelos resultados exibidos nos GRÁFICOS 1a e 2a que houve diferença significativa nas concentrações de açúcar total quantificadas no início do processo, nas concentrações de açúcar residual total e nos valores de teor alcoólico determinados após 24 horas de fermentação ($p < 0,05$).

GRÁFICO 3 - CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR TOTAL (g.L⁻¹), TEOR ALCOÓLICO (°GL) À 20 °C (a), pH E CONCENTRAÇÃO DE ACIDEZ VOLÁTIL (meq.L⁻¹) (b) NO PROCESSO COM MOSTO MELAÇO DE SOJA E INICIADO COM 0,2 g.L⁻¹ DE CÉLULAS DA LEVEDURA COMERCIAL *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1).



FONTE: O autor (2015).

NOTA: Resultados estão representados no gráfico:

- (a) Concentração de açúcar total pela linha contínua (_____)
- Teor alcoólico pela linha tracejada e pontilhada (_ . _ . _ .)
- (b) Valor de pH pela linha pontilhada (.)
- Concentração de acidez volátil pela linha tracejada (- - - -).

Os valores representados nos GRÁFICOS 2a e 3a mostram que houve uma diminuição do teor alcoólico ($p < 0,05$) em torno de 20% em 24 horas, no processo realizado com concentração inicial de 0,2 g.L⁻¹ de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1). Os resultados demonstrados sugerem que a adaptação das células ao meio de melaço de soja favoreceu a formação de etanol, em 24 horas.

Também, verifica-se nos resultados que não existem diferenças significativas nas concentrações de açúcares totais no início e no final no meio dos processos. As concentrações iniciais de açúcar total indicam que a adição do ácido sulfúrico no mosto de melaço de soja contribuiu para a homogeneidade do meio.

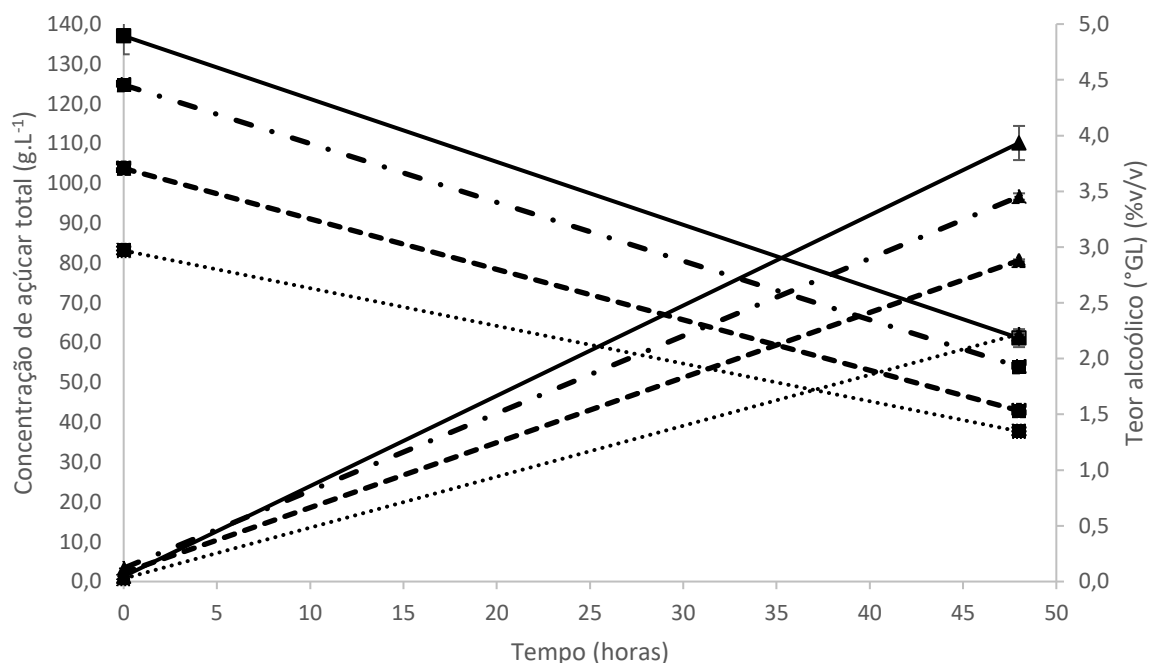
Nos resultados apresentados nos GRÁFICOS 2b e 3b percebe-se uma diminuição no valor de pH do meio e um incremento na acidez volátil de acordo com o etanol formado durante as fermentações.

Em virtude de a empresa fornecedora de matéria-prima ter a intenção de redução de custos com o destino final do resíduo agroindustrial melaço de soja e que a adaptação de células, apesar de fornecer maior valor de teor alcoólico, fornece custo e maquinário que a indústria não apresenta, as células de *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1) não foram adaptadas em meio de melaço de soja para processos posteriores.

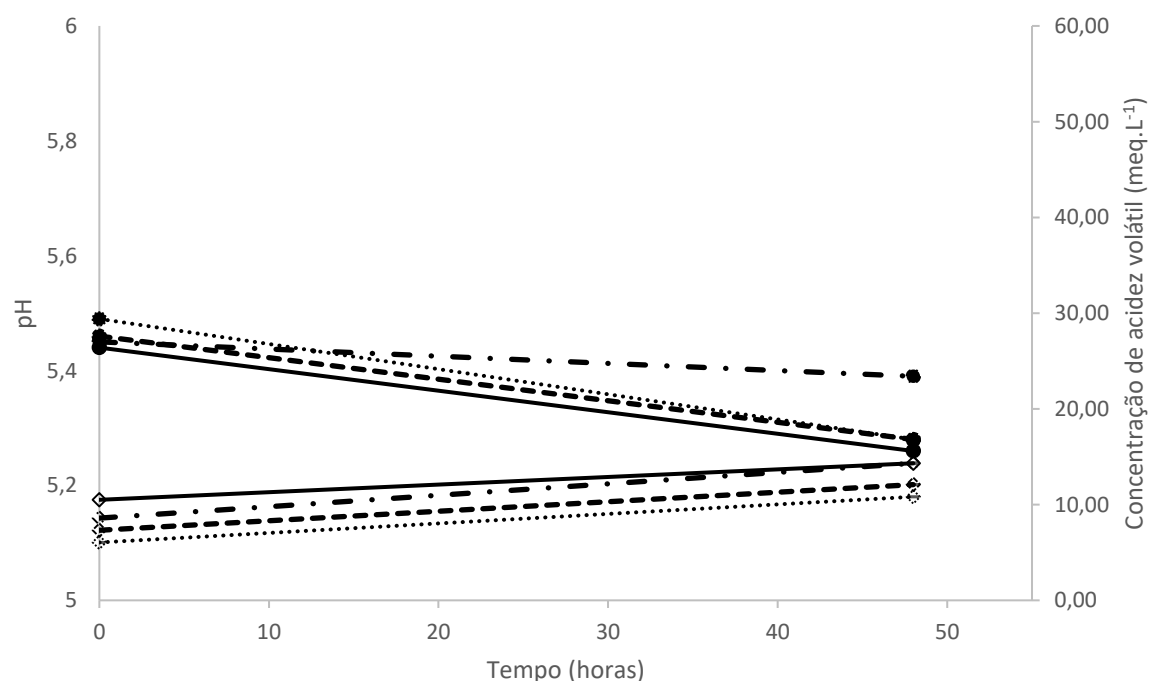
Após a análise das concentrações do açúcar residual total dos processos apresentados nas GRAFICOS 1a, 2a e 3a constatou-se que aproximadamente 50% da concentração de açúcar inicial total não foi convertido em etanol pela levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1). Desta forma, foram delineados experimentos para avaliar a concentração de melaço de soja no mosto dos processos e os resultados estão representados nos GRÁFICOS 4a e 4b.

GRÁFICO 4 - CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR TOTAL (g.L^{-1}), TEOR ALCOÓLICO ($^{\circ}\text{GL}$) À 20 $^{\circ}\text{C}$ (a), pH E CONCENTRAÇÃO DE ACIDEZ VOLÁTIL (meq.L^{-1}) (b) NO PROCESSO COM MOSTO MELAÇO DE SOJA E INICIADO COM $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ DE CÉLULAS DA LEVEDURA COMERCIAL *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1).

(a)



(b)



FONTE: O autor (2015).

NOTA: Resultados dos processos com concentração inicial de melaço de soja estão representados: 18% (p/v) linhas pontilhadas (.....), 22,5% (p/v) linhas tracejadas (-----), 27% (p/v) linhas tracejadas e pontilhadas (-.-.-.-), 31,41% (p/v) linhas contínuas (_____).

De acordo com os resultados do GRAFICO 4a, a concentração inicial e final de açúcar total foi diferente entre si para todos os processos conduzidos com diferentes concentrações iniciais de melaço de soja ($p < 0,05$). No entanto, em relação ao consumo de açúcares totais, para todos os processos, foi entre 40 e 50%.

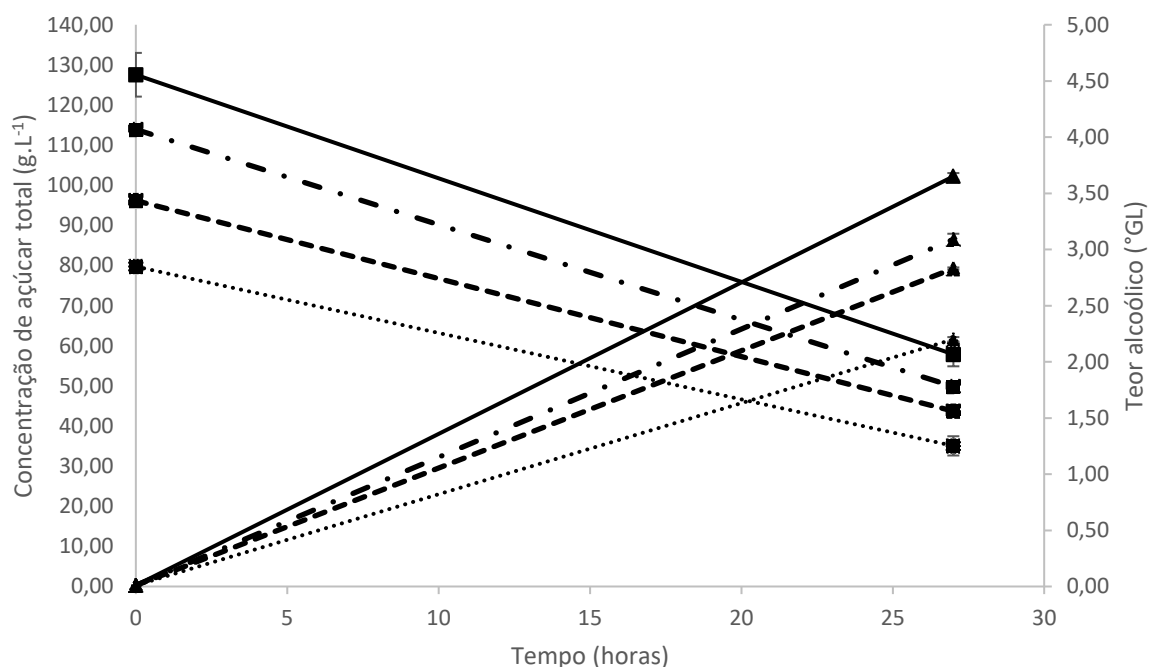
Considerando os dados apresentados no GRÁFICO 4a, as concentrações iniciais de melaço de soja no mosto dos processos de 27% (p/v) e de 31,41% (p/v) produziram teor alcoólico a 20 °C equivalente ($p > 0,05$) após 48 horas de processo, 3,47 °GL (%v/v) e 3,93 °GL (%v/v), respectivamente. Já, os processos realizados com concentração inicial de melaço de soja de 18% (p/v) foram de 2,22 °GL (%v/v) e 22,5% (p/v) de 2,88 °GL (%v/v).

Além disso, no GRAFICO 4 (b), visualiza-se que os processos iniciados com diferentes concentrações de melaço de soja iniciaram com valores semelhantes de pH, em torno de 5,4. Em relação à acidez volátil, da mesma forma que com o teor alcoólico, os processos realizados com as concentrações iniciais de melaço de soja no mosto dos processos de 27% (p/v) e de 31,41% (p/v) foram obtidos valores semelhantes, cerca de 14,2 meq.L⁻¹.

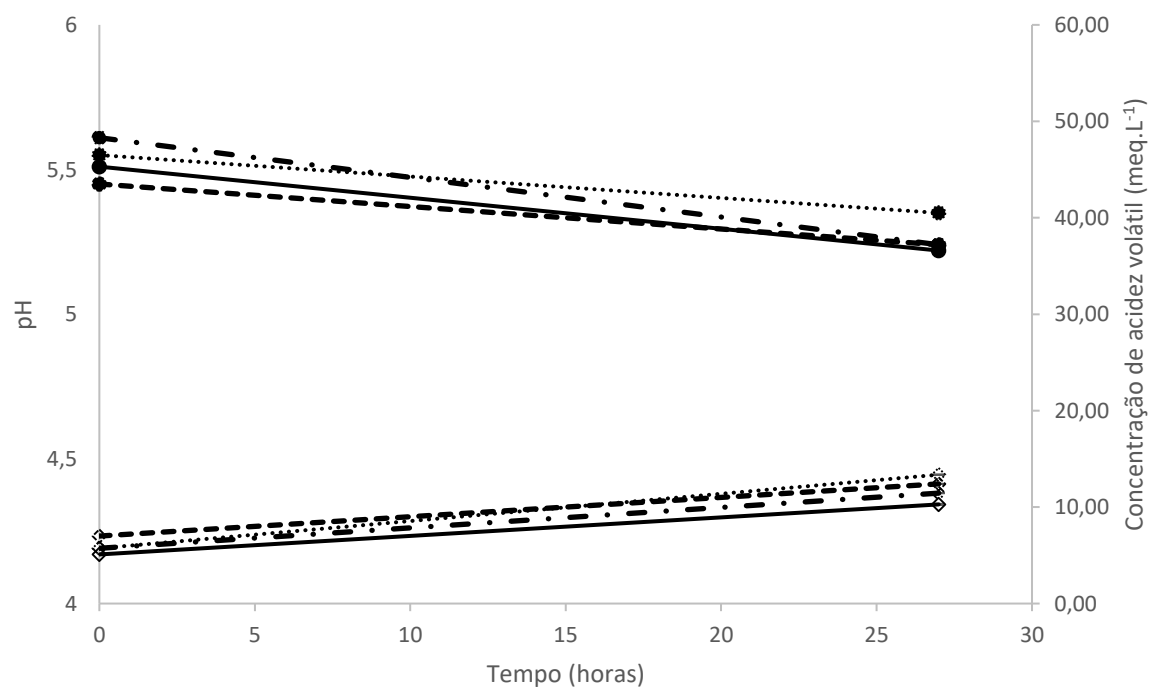
Considerando os resultados apresentados nos GRÁFICOS 2a e 4a, para os processos com concentração inicial de açúcar total de 120 g.L⁻¹, houve um consumo de em torno de 50% em 48 horas e 24 horas, respectivamente. Assim, para verificar a influência no tempo de processo da adição de ácido sulfúrico no mosto, foram conduzidos processos com diferentes concentrações iniciais de melaço de soja, semelhantes aos processos representados no GRÁFICO 4.

GRÁFICO 5 - CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR TOTAL (g.L^{-1}), TEOR ALCOÓLICO ($^{\circ}\text{GL}$) À 20 $^{\circ}\text{C}$ (a), pH E CONCENTRAÇÃO DE ACIDEZ VOLÁTIL (meq.L^{-1}) (b) NO PROCESSO COM MOSTO MELAÇO DE SOJA ADICIONADO DE ÁCIDO SULFÚRICO E INICIADO COM 1,0 g.L^{-1} DE CÉLULAS DA LEVEDURA COMERCIAL *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1).

(a)



(b)



FONTE: O autor (2015)

NOTA: Resultados dos processos com concentração inicial de melaço de soja estão representados: 18% (p/v) linhas pontilhadas (.....), 22,5% (p/v) linhas tracejadas (- - - -), 27% (p/v) linhas tracejadas e pontilhadas (_.-._.-), 31,41% (p/v) linhas contínuas (_____).

De acordo com os resultados apresentados no GRÁFICO 5a foi verificado que as concentrações iniciais e finais de açúcar total e teor alcoólico são diferentes em todos os processos realizados ($p < 0,05$). Os valores de teor alcoólico, a 20 °C, dos processos iniciados com concentrações de 18% (p/v), 22,5% (p/v), 27% (p/v) e 31,41% (p/v) de melaço de soja foram de 2,20 °GL (%v/v), 2,83 °GL (%v/v), 3,09 °GL (%v/v) e 3,65 °GL (%v/v), respectivamente.

Ao comparar os resultados apresentados nos GRÁFICOS 4 e 5, em que empregou-se quantidades iniciais de melaço de soja no mosto de 18% (p/v), 22,5% (p/v), 27% (p/v) e 31,41% (p/v) sem e com adição de ácido sulfúrico previamente a esterilização do meio de processo, verificou-se que inicialmente as concentrações iniciais de açúcar total são menores para os mostos tratados com ácido ($p < 0,05$). Sugere-se que a diminuição do açúcar total inicial nos mostos com quantidade inicial semelhante de melaço de soja possa ser devido ao pH ácido (valor de pH inicial de 3,5) do meio do processo durante o período de esterilização, gerando produtos de degradação de carboidratos, como hidroximetilfurfural e furfural (LOMAN; JU, 2016).

Em relação ao teor alcoólico, os processos conduzidos com quantidades iniciais de melaço de soja de 23% (p/v) e 27% (p/v) apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) sem e com a adição de ácido sulfúrico previamente a esterilização ao meio. Para os processos realizados com quantidade inicial de melaço de soja de 31,41% (p/v) e aproximadamente 13% (p/v) de açúcar total, constatou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores de teor alcoólico formado nos processos representados nos GRÁFICOS 4 e 5.

Bajaj, Taank e Thakur (2005) apontam que a maioria dos processos fermentativos para produção de etanol são conduzidos em mostos diluídos com concentrações entre 12 a 17% de açúcares fermentescíveis. No entanto, a maioria das leveduras utilizadas em processos fermentativos industriais não crescem em melaços com altas concentrações de sólidos solúveis devido ao estresse osmótico. Ferrari (2013) complementa que altas concentrações de açúcares podem afetar a viabilidade das células e ocasionar fermentações lentas e incompletas, entretanto, geram altas concentrações de etanol.

Apesar dos resultados estatísticos indicarem que a adição de ácido sulfúrico no mosto não interfere no teor de álcool produzido entre os processos realizados com 31,41% (p/v) de melaço de soja (GRÁFICOS 4 e 5), houve uma diminuição de tempo de fermentação de 20 horas entre os processos conduzidos sem e com a

adição de ácido. Desta forma, a adição do ácido sulfúrico parece possibilitar o maior aproveitamento do resíduo agroindustrial melaço de soja. Por exemplo, em um período de 30 dias, uma quantidade de 633 kg% (p/v) resíduo melaço de soja poderá ser destinado a fermentação alcoólica, comparativamente a 471,15 kg% (p/v) se o resíduo não for previamente acidificado. E, como já havia sido constatado nos processos com os resultados demonstrados no GRAFICO 2, houve a facilitação na amostragem pela maior homogeneidade do mosto.

Também, é importante considerar que para garantir, em condições econômicas, a fermentação de um dado volume de mosto de melaço de soja, deve-se determinar a concentração adequada de inóculo para iniciar os processos fermentativos. Nos processos realizados em que os resultados estão representados nos GRÁFICOS 4 e 5 somente foi utilizada a concentração inicial de inóculo 1 g.L⁻¹ de células da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1).

Segundo Machado (1999) para produção de etanol em batelada, são adicionadas em torno de 0,2 g.L⁻¹ de leveduras liofilizadas. Estes processos fermentativos duram em torno de 24 a 48 horas. Entretanto, para reduzir o tempo de fermentação e de contaminação, inóculos maiores podem ser utilizados.

Breisha (2010) conduziu processos fermentativos com substrato de sacarose a 36% (p/v) e duas concentrações de inóculo de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, 3 e 6% (v/v). O processo fermentativo realizado com concentração inicial de inóculo de 6% (v/v) resultou na maior concentração de etanol e diminuiu o tempo do processo de 72 horas para 48 horas.

Yan et al. (2013) verificaram o efeito da concentração inicial de inóculo em processos fermentativos utilizando resíduos de cozinhas hidrolisados com concentração inicial de açúcares de 200 g.L⁻¹. Os autores utilizaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em concentrações de 2, 4 e 6% (v/v). O melhor rendimento de etanol foi no processo fermentativo com concentração inicial de inóculo de 2% (v/v).

Segundo Ding et al. (2009) a concentração inicial de inóculo é um dos fatores que mais influenciam o processo fermentativo. Este parâmetro determina o tempo do processo, consumo da fonte de carboidratos e a qualidade e quantidade do metabólito final, o etanol. Desta forma, também, é necessário determinar a concentração inicial de inóculo de células da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-1).

Com intuito de aumentar a utilização do resíduo agroindustrial melaço de soja e melhorar a viabilidade econômica da produção de álcool, é necessário otimizar os parâmetros do processo fermentativo.

5.1 PLANEJAMENTO FATORIAL

Um processo fermentativo para se tornar atraente comercialmente deve ser otimizado para evitar perdas e custos. Uma das formas de otimizar um processo é por meio da ferramenta estatística planejamento fatorial que, segundo Wang et al. (2008) e El-Gendy, Madian e Amr (2013), é uma técnica que tem sido utilizada com sucesso em vários campos de estudos. A metodologia de superfície de resposta foi escolhida para otimizar a utilização do resíduo melaço de soja no processo fermentativo para produção de etanol. Segundo El-Gendy, Madian e Amr (2013), esta metodologia é a combinação de técnicas matemáticas e estatísticas usadas para modelar e analisar problemas nos quais a resposta de interesse é influenciada por mais de uma variável. Seu objetivo é a otimização da resposta de interesse como, por exemplo, o produto etanol.

As duas variáveis avaliadas foram a concentração inicial de inóculo, variando de $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ até 17 g.L^{-1} e concentração inicial de açúcar total, variando de 100 g.L^{-1} até 200 g.L^{-1} , visto que variáveis como valor de pH e temperatura foram fixadas em torno de 5,5 e $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. As condições dos processos fermentativos obtidos por meio da metodologia de superfície de resposta estão listadas na TABELA 5.

TABELA 5 - CONDIÇÕES DELINEADAS PELA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Ordem dos experimentos	Valores reais e codificados para a Concentração inicial de inóculo (g.L^{-1})	Valores reais e codificados para a Concentração inicial de açúcares (g.L^{-1})
1	10,75 (0)	220,71 (+1,41)
2	17 (+1)	200 (+1)
3	19,59 (+1,41)	150 (0)
4	10,75 (0)	150
5	17 (+1)	100 (-1)
6	4,5 (-1)	200 (+1)
7	1,91 (-1,41)	150
8	10,75 (0)	150
9	10,75 (0)	150
10	4,5 (-1)	100 (-1)
11	10,75	79,29 (-1,41)
12	10,75	150
13	10,75	150

FONTE: O autor (2015).

Na TABELA 6 está representada a análise do modelo de regressão para a resposta teor alcoólico.

TABELA 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO MODELO DE REGRESSÃO PARA A RESPOSTA TEOR ALCOÓLICO

Termo		Estimativa	Erro padrão	t	Valor p
Constante		4,966	0,223	22,32	0,000
X_1		0,420	0,176	2,39	0,048
X_2		-0,618	0,176	-3,52	0,010
$X_1 * X_1$		-0,296	0,189	-1,57	0,160
$X_2 * X_2$		-1,806	0,189	-9,57	0,000
$X_1 * X_2$		0,593	0,249	2,38	0,049

FONTE: O autor (2015).

NOTA: X_1 e X_2 representam respectivamente a concentração inicial de inóculo e a concentração inicial de açúcar total, respectivamente

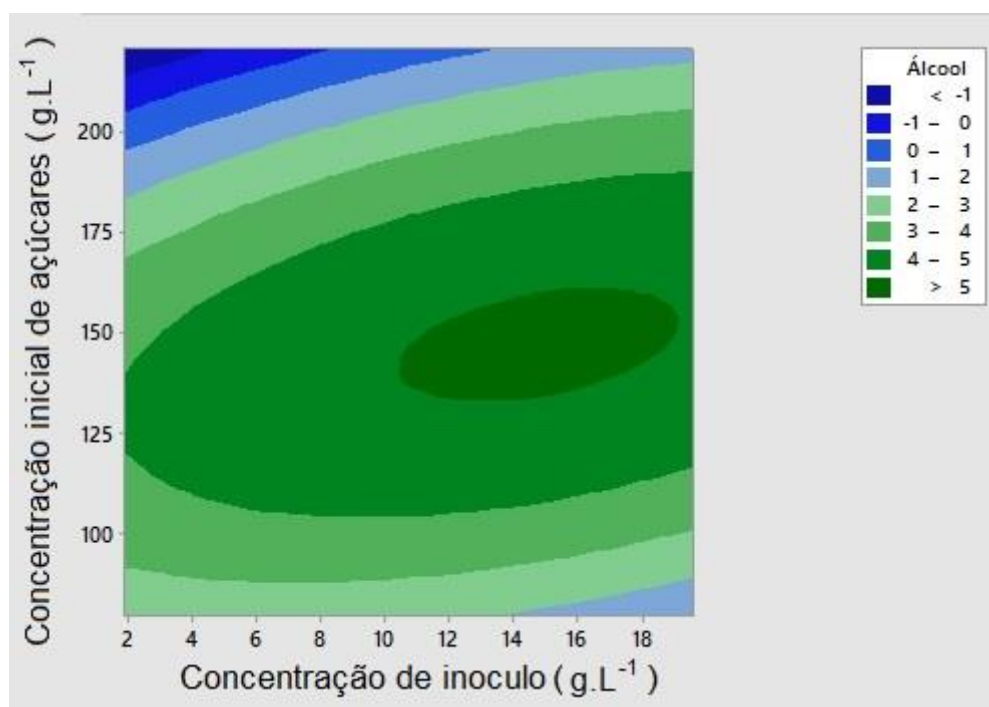
De acordo com a análise de variância para a resposta teor alcoólico, as concentrações iniciais de inóculo (X_1) e de açúcar total (X_2) apresentaram efeito significativo no teor alcoólico ($p < 0,05$). Também foram considerados significativos o efeito quadrático da concentração inicial de açúcar total ($p < 0,05$) e o efeito de interação entre a concentração inicial de inóculo e a concentração inicial de açúcar total ($p < 0,05$). O valor do coeficiente de determinação (R^2) foi de 94,29% indicando um bom ajuste do modelo e o valor da falta de ajuste foi de 0,004. O efeito quadrático da concentração inicial de inóculo não foi considerado na equação matemática, visto que esta variável não foi considerada significativa ($p > 0,05$).

A equação matemática que descreve a relação entre as variáveis testadas e a resposta teor alcoólico é:

$$Y = 4,966 (\pm 0,223) + 0,420 (\pm 0,176) X_1 - 0,618 (\pm 0,176) X_2 - 1,806 (\pm 0,189) X_2^2 + 0,593 (\pm 0,249) X_1 X_2$$

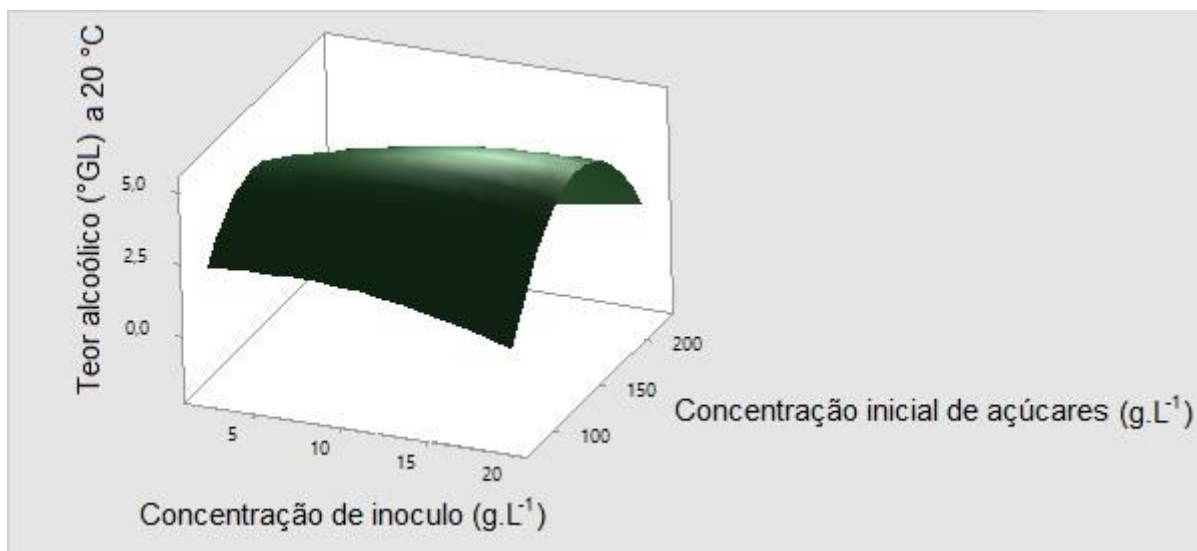
O gráfico de contorno e de superfície de resposta para o teor alcoólico estão representados no GRÁFICO 6 e 7, respectivamente. A análise gráfica indica que os maiores teores alcoólicos são obtidos em concentrações de inóculo entre aproximadamente 11 e 19 g.L⁻¹ e concentrações iniciais de açúcares totais entre 125 e 175 g.L⁻¹.

GRÁFICO 6 - GRÁFICO DE CONTORNO PARA A RESPOSTA TEOR ALCOÓLICO



FONTE: O autor (2016)

GRÁFICO 7 - GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O TEOR ALCOÓLICO



FONTE: O autor (2016)

Para a otimização do processo, a concentração inicial de inóculo de $14,77 \text{ g.L}^{-1}$ e a concentração inicial de açúcar total de $146,429 \text{ g.L}^{-1}$ foram indicadas como as condições ótimas para a obtenção do teor alcoólico máximo de $5,12 \text{ °GL}$ a 20 °C .

Para a validação do modelo, foram realizados processos utilizando as condições ótimas das variáveis de concentração inicial de inóculo e concentração

inicial de açúcar total, os quais resultaram em teor alcoólico de $4,51 \pm 0,23$ °GL a 20 °C após 36 horas. Este resultado de teor alcoólico está de acordo com o indicado para a obtenção de teor alcoólico com as condições ótimas previstas pelo planejamento fatorial.

Oberoi et al. (2011) ao realizarem testes para obtenção de etanol utilizando cascas de banana em pó obtiveram concentração de etanol de $28,2 \text{ g.L}^{-1}$ em 12 horas em processo fermentativo realizado com inóculo inicial de 10% (v/v) da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, pH inicial de 5,5 e suplementação do mosto com extrato de levedura, peptona, sulfato de magnésio, celulase e pectinase. Após a otimização do processo por metodologia de superfície de resposta, os autores obtiveram a concentração máxima de etanol de $27,0 \text{ g.L}^{-1}$ em 20 horas.

Wang et al. (2008) utilizaram planejamento fatorial, empregando a metodologia planejamento composto central (Central composite design - CCD), para otimizar a produção de etanol com resíduos provenientes de cozinhas. Os autores utilizaram no processo fermentativo a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, pH 5,5, temperatura de 35 °C e obtiveram na condição otimizada $33,05 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol em 67,6 horas.

Dragone et al. (2011) utilizaram como variáveis a temperatura, concentração inicial de lactose e concentração de inóculo inicial para delinear o planejamento fatorial 2^3 (dois níveis e três variáveis) do processo fermentativo utilizando proteína de queijo em pó. Os autores obtiveram concentração de etanol de $80,95 \text{ kg.m}^{-3}$ ao utilizarem a concentração inicial de lactose de 200 kg.m^{-3} a 35 °C e 1 kg.m^{-3} de concentração inicial de inóculo utilizando a levedura *Kluyveromyces fragilis*.

Luo, Wang e Shahbazi (2014) ao empregarem o planejamento fatorial 3^3 (três níveis e três variáveis) para otimizar o processo fermentativo utilizando como substrato o suco de sorgo doce estipularam que a temperatura de fermentação ocorreria a 35 °C, a concentração de inóculo inicial de levedura seria de 1 g.L^{-1} e que a concentração inicial de sólidos seria de 13%. Com estes parâmetros os autores previram uma concentração final de etanol de $49,48 \text{ g.L}^{-1}$ após 72 horas de fermentação.

Suman et al. (2011) utilizaram planejamento fatorial para a obtenção de etanol a partir da manipueira, que é um resíduo do processamento da fécula e da farinha de mandioca, empregando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O processo fermentativo realizado pelos autores com maior produção de etanol

(4,08%) foi realizado a 19 °C, pH 5,6, 3% (v/v) de inóculo inicial de levedura e, em torno de 20 a 26 horas de tempo de fermentação.

El-Gendy, Madian e Amr (2013) utilizaram planejamento fatorial 2^4 (dois níveis e quatro variáveis) para otimizar processo fermentativo com melaço de cana-de-açúcar empregando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os autores obtiveram produção de etanol maximizada em 71 horas utilizando concentração inicial de melaço de cana-de-açúcar de 18%, pH 5,6 e temperatura de 38 °C.

Nas condições otimizadas, previstas no planejamento fatorial de concentração inicial de inóculo de $14,77 \text{ g.L}^{-1}$ e a concentração inicial de açúcar total de $146,429 \text{ g.L}^{-1}$ obteve-se o teor alcoólico de $4,51 \pm 0,23 \text{ }^\circ\text{GL}$, em 36 horas. Isto é, uma diminuição de aproximadamente 473 g do resíduo agroindustrial melaço de soja, dependendo da safra da soja, que iria ser destinado ao tratamento final de resíduos sem nenhum reaproveitamento comercial para a indústria. Em 30 dias de fermentação, esta quantidade representaria 9,46 kg de melaço de soja reaproveitados para 1 litro de mosto do processo fermentativo realizado.

A vinhaça, resíduo proveniente da destilação do líquido fermentado oriundo dos processos utilizando mosto melaço de soja, poderá ser vendido ou empregado pela própria empresa como adubo na agricultura.

6 CONCLUSÃO

A produção de álcool utilizando as condições ambientais concentração inicial de inóculo de $14,77 \text{ g.L}^{-1}$ e a concentração inicial de açúcar total de $146,429 \text{ g.L}^{-1}$ previstas na estratégia de otimização da metodologia de superfície de resposta permitiu a diminuição da quantidade do resíduo agroindustrial melaço de soja.

A empresa fornecedora de matéria-prima deste trabalho já possui as instalações necessárias para a realização do processo. Também, há a formação do produto de valor econômico agregado álcool para a utilização pela própria empresa, reduzindo custos. Há diminuição do impacto ambiental dos processos realizados pela empresa, uma vez que há a diminuição de volume do resíduo agroindustrial melaço de soja. Além disso, a empresa pode obter lucro vendendo ou utilizando a vinhaça como adubo para a produção de sua matéria-prima principal a soja.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Boletim de etanol nº 06/2016**. Disponível em: < www.anp.gov.br>. Acesso em: 23 abr. 2016.

ALEXANDRINO, N. **Melhoramento de leveduras para fermentação de alto teor alcoólico mediante hibridação e evolução adaptativa**. 102 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Setor de Microbiologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". São Paulo, 2012.

ANGELONI, L. H. P. **Bioacúmulo de alumínio e seus efeitos tóxicos na fermentação alcoólica em linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae***. 125 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Setor de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". São Paulo, 2009.

ANTONANGELO, A. T. B. F. **Genotipagem de leveduras presentes no processo industrial de produção de álcool combustível e estudo do polimorfismo de genes envolvidos no processo fermentativo em *Saccharomyces cerevisiae***. 83 f. Tese (Doutorado em Genética) - Setor de Genética, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu. São Paulo, 2012.

BAJAJ, B. K.; TAANK, V.; THAKUR, R. L. Potential industrial applications of yeast capable of fermenting high gravity cane molasses despite physiological stress. **Indian Journal of Biotechnology**. India, v. 04, p.149-152. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº24 de 8 de setembro de 2005. Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 08 set. 2005.

BREISHA, G. Z. Production of 16% ethanol from 35% sucrose. **Biomass and Bioenergy**. United Kingdom, v. 34, p.1243-1249. 2010.

BROWN, N. A.; CASTRO, P. A.; FIGUEIREDO, B. C. P.; SAVOLDI, M.; BUCKERIDGE, M. S.; LOPES, M. L.; PAULLILO, S. C. L.; BORGES, E. P.; AMORIM, H. V.; GOLDMAN, M. H. S.; BONATTO, D.; MALAVAZI, I.; GOLDMAN, G. H. Transcriptional profiling of Brazilian *Saccharomyces cerevisiae* strains selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. **FEMS Yeast Research**. United Kingdom, v. 13, p.277-290. 2013.

COSTA, D. A., SOUZA, C. J., COSTA, P. S., RODRIGUES, M. Q., SANTOS, A. F., LOPES, M. R., GENIER, H. L., SILVEIRA, W. B., FIETTO, L. G. Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Germany, v. 98, p.3829-3840. 2014.

DING, M. Z.; TIAN, H. C.; CHENG, J. S.; YUAN, Y. J. Inoculum size-dependent interactive regulation of metabolism and stress response of *Saccharomyces cerevisiae* revealed by comparative metabolomics. **Journal of Biotechnology**. Netherlands, v.144, p.279-286. 2009.

DRAGONE, G. MUSSATTO, S. I.; SILVA, J. B. A.; TEIXEIRA, J. A. Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. **Biomass and Bioenergy**. United Kingdom, v.35, p.1977-1982. 2011.

DUARTE, W. F.; DRAGONE, G.; DIAS, D. R.; OLIVEIRA, J. M.; TEIXEIRA, J. A.; SILVA, J. B. M.; SCHWAN, R. S. Fermentative behaviour of *Saccharomyces* strains during microvinification of raspberry juice (*Rubus idaeus* L.). **International Journal of Food Microbiology**. Netherlands, v. 143, p.173-182. 2010.

EL-GENDY, N. S.; MADIAN, H. R.; AMR, S. S. A. Design and optimization of a process for sugarcane molasses fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology. **International Journal of Food Microbiology**. Netherlands, v. 2013, 9 pages. 2013.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Soja em números**. Disponível em: < <http://www.cnpso.embrapa.br/sojaemnumeros/>>. Acesso em: 24 ago. 2014.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Árvore do conhecimento**. Curitiba, 2016. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fbl23vmz02wx5eo0sawqe3vtdl7vi.html>>. Acesso em: 20 ago. 2016.

FERRARI, F. C. S. **Fatores operacionais e cinética do processo fermentativo para otimização da produção de etanol em escala industrial**. 74f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Setor de Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, 2013.

FULL, T.; JUNG, D.; MADIGAN, M. Production of poly- β -hydroxyalkanoates from soy molasses oligosaccharides by new, rapidly growing *Bacillus* species. **Letters in Applied Microbiology**. England, v. 43, p.377-384. May 2006.

HALABI, A. F. **Efeito do extrato de própolis sobre a composição e a qualidade do destilado alcoólico**. 74 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Setor de Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. São Paulo, 2010.

HISS, H. **Cinética de processos fermentativos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

IMPORTAÇÃO, EXPORTAÇÃO E INDÚSTRIA DE ÓLEOS S.A. (IMCOPA). Araucária, 2016. Disponível em: <<http://www.imcopa.com.br/>>. Acesso em: 20 ago. 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estatística da produção agrícola: julho de 2016**. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fasciculo_Indicadores_IBGE/estProdAgr_201607.pdf>. Acesso em 20 ago. 2016.

INSTITUTO DA CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. **Relatório de Inteligência:** do bagaço ao posto. Disponível em: <http://www.icna.org.br>>. Acesso em: 24 ago. 2014.

JUNIOR, O. P. **Metabolização de açúcares em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com e sem transportador de sacarose e diferentes atividades de invertase.** 107 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Setor de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". São Paulo, 2006.

KARP, S. G.; IGASHIYAMA, A. H.; SIQUEIRA, P. F.; CARVALHO, J.C.; VANDENBERGHE, L. P.; THOMAZ-SOCCOL, V.; CORAL, J.; THOLOZAN, J.-L.; SOCCOL, C. R. Application of the biorefinery concept to produce L-lactic acid from the soybean vinasse at laboratory and pilot scale. **Bioresource Technology**. England, v. 102, p. 1765-1772. January 2011.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de Etanol. In: LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Ed. Edgard Blucher Ltda., v. 3, 2001. P. 1-43

LEITE, R. C.; CORTEZ, L. A. B. **O etanol combustível no Brasil**. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 23 ago. 2014.

LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R. Ethanol production from soybean molasses by *Zymomonas mobilis*. **Biomass and Bioenergy**. United Kingdom, v. 44, p. 80-86. 2012.

LOMAN, A. A.; JU, L.-K. Soybean carbohydrate as fermentation feedstock for production of biofuels and value-added chemicals. United Kingdom, v. 51, p. 1046-1057. August 2016.

LUO, Z.; WANG, L.; SHAHBAZI, A. Optimization of ethanol production from sweet sorghum (*Sorghum bicolor*) juice using response surface methodology. **Biomass and Bioenergy**. United Kingdom, v. 67, p. 53-59. 2014.

MACHADO, R. P. **Produção de etanol a partir de melaço de soja.** 137 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Setor de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1999.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Projeções do Agronegócio:** 2012/2013 a 2022/2023. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 24 ago. 2014.

MONTELONGO, J. L.; CHASSY, B. M.; McCORD, J. D. *Lactobacillus salivarius* for conversion of soy molasses into lactic acid. **Journal of Food Science**. United States, v. 58, p. 863-866. July 1993.

MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, M. C. **Wine Chemistry and Biochemistry**. New York: Springer Science+Business Media, 2009.

NARENDRANATH, N. V.; POWER, R. Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of *Lactobacilli* and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. **Applied and Environmental Microbiology**. United States, v. 71, p. 2239-2243. 2005.

OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V.; SAIDA, L.; BANSAL, S.; HUGHES, J. D. Ethanol production from banana peels using statistically optimized simultaneous saccharification and fermentation process. **Waste Management**. United States, v. 31, p. 1576-1584. 2011.

OLIVEIRA, M. E. S.; PANTOJA, L.; DUARTE, W. F.; COLLELA, C. F.; VALARELLI, L. T.; SCHWAN, R. F.; DIAS, D. R. Fruit wine produced from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) by both free and immobilised yeast cell fermentation. **Food Research International**. Canada, v.44, p.2391-2400. 2011.

PAP, N.; PONGRÁCZ, E.; MYLLYKOSKI, L.; KEISKI, R. L. Waste minimization and utilization in the food industry: valorization of food industry wastes and by-products. In: SAHU, J. K. (ed.). **Introduction to advanced food processing engineering**. United States: CRC Press, 2014. p. 595-630.

REIS, V. R. **Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de álcool**. 81 f. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Setor de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", São Paulo, 2011.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. **Fueling a high octane future: 2016 Ethanol Industry Outlook**. Disponível em: <
<http://www.ethanolrfa.org/resources/publications/outlook/>>. Acesso em: 23 mai. 2016.

ROMÃO, B. B.; SILVA, F. B.; RESENDE, M. M.; CARODOSO, V. L. Ethanol production from hydrolyzed soybean molasses. **Energy Fuels**. United States, v. 26, p. 2310-2316. March 2012.

SANTOS, E. F. S.; SCHAUTZ, L. C. A.; CARDOSO, C. A. L.; ERNANDES, J. R.; BATISTOTE, M. O efeito da complexidade estrutural da fonte de carbono e nitrogênio no desempenho fermentativo de leveduras industriais. **Ciência e Natura**. Brasil, v. 35, p. 09-14. 2013.

SALVATO, F. **Fermentação de mosto industrial por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e sobreexpressão de invertase interna: estudo comparativo com linhagens de alta e baixa atividade de invertase externa**. 94 f. (Dissertação de mestrado) - Setor de Microbiologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", São Paulo, 2010.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**. United States, v. 37, p. 19-27. January 2012.

SILVA, F.; ROMÃO, B. B.; CARODO, V. L.; FILHO, U. C.; RIBEIRO, E. J. Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed soybean molasses. **Biochemical Engineering Journal**. United States, v. 69, p. 61-68. 2012.

SIQUEIRA, P. F.; KARP, S. G.; CARVALHO, J. C.; STURM, W.; RODRÍGUEZ-LEON, J. A.; THOLOZAN, J-L, SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**. England, v. 99, p. 8156-8163. 2008.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. Brasil: Edgard Blücher LTDA, 2001. v.2: Engenharia química.

SCHOPF, N.; ERBINO, P.; PUVOGEL, A. Alternative Fuels: Energetic use of liquid by-products from sugar and soy processing. **Sugar Technology**. India, v. 16, p. 333-338. December 2014.

SOLAIMAN, D. K.; ASHBY, R. D.; ZERKOWSKI, J. A.; FOGLIA, T.A. Simplified soy molasses-based médium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. **Biotechnology Letters**. Netherlands, v. 29, p. 1341-1347. May 2007.

SOLAIMAN, D. K.; ASHBY, R .D; HOTCHKISS JR., A. T.; FOGLIA, T. A. Biosynthesis of medium-chain-length poly (hydroxyalkanoates) from soy molasses. **Biotechnology Letters**. Netherlands, v. 28, p. 157-162. February 2006.

SUMAN, P. A.; URBANO, L. H.; LEONEL, M.; MISCHAN, M. M. Efeitos de parâmetros de fermentação na produção de etanol a partir de resíduo líquido da industrialização da mandioca (manipueira). **Acta Scientiarum Technology**. Brasil, v. 33, p. 379-384. 2011.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **World Agricultural Production**. Disponível em: <
<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2016.

WANG, Q.; MA, H.; XU, H.; GONG, L.; ZHANG, W.; ZOU, D. Ethanol production from kitchen garbage using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**. United States, v. 39, p. 604-610. 2008.

YAN, S.; CHEN, X.; WU, J.; WANG, P. Pilot-scale production of fuel ethanol from concentrated food waste hydrolysates using *Saccharomyces cerevisiae* H058. **Bioprocess Biosystem Engineering**. Germany, v. 36, p. 937-946. 2013.